

CAMILLE SILVA FLORENCIO

Padronização e análise de transformação genética em *Fonsecaea pedrosoi* utilizando bombardeamento de partículas e *Agrobacterium tumefaciens*

BRASÍLIA-DF, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM  
SAÚDE

CAMILLE SILVA FLORENCIO

Padronização e análise de transformação genética em *Fonsecaea pedrosoi* utilizando bombardeamento de partículas e *Agrobacterium tumefaciens*

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos

BRASÍLIA

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sp Silva Florencio, Camille  
Padronização e análise de transformação genética em  
Fonsecaea pedrosoi utilizando bombardeamento de partículas e  
Agrobacterium tumefaciens / Camille Silva Florencio;  
orientador Larissa Fernandes Matos. -- Brasília, 2017.  
156 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e  
Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. Fonsecaea. 2. Transformação genética. 3. Biobalística.  
4. Agrobacterium. I. Fernandes Matos, Larissa, orient. II.  
Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM  
SAÚDE

Camille Silva Florencio

Padronização e análise de transformação genética em *Fonsecaea pedrosoi* utilizando bombardeamento de partículas e *Agrobacterium tumefaciens*

Brasília, 29 de agosto de 2017.

**Banca Examinadora:**

Presidente: Larissa Fernandes Matos – UnB

Membro efetivo: Alex Leite Pereira– UnB

Membro efetivo: Francisco Aragão – EMBRAPA

Membro Suplente: Janice Lisboa De Marco- UnB



*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino e meu guia, aos meus pais Francisca Edna e Manoel, a minha avó Adélia, a minha irmã Thayane e ao Alexander Ricardo pela compreensão, carinho, paciência, ajuda e incentivo em todas as minhas escolhas e decisões.*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por todas as oportunidades e conquistas que Ele me possibilita, pelo dom da minha vida e de todas as pessoas que estiveram presentes nela durante este tempo.

Aos meus pais, Francisca Edna e Manoel Florencio, por todo amor, carinho e cuidado comigo, principalmente a minha mãe pela paciência, pelos conselhos, e por tentar me ajudar sempre a tonar todos os meus sonhos possíveis.

A toda minha família, em especial minha avó Adélia Fernandes, que sempre esteve ao meu lado, e minha prima Karollyne que me possibilitou e incentivou a buscar esse sonho.

A minha querida irmã Thayane, que sempre foi uma ótima amiga, e sempre me deu bons conselhos e me estimulou a buscar e realizar meus sonhos.

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora Dra. Larissa Fernandes Matos pela grande oportunidade, por todos os ensinamentos ao longo desse período, pela paciência, pela dedicação em me ensinar, pela amizade e por todo o suporte dado para que fosse possível a realização deste trabalho.

A todos os meus companheiros de laboratório, que sempre me ajudaram, em especial a minha amiga Narla Verorrayne pelo companheirismo e Fabiana Brandão sempre prestativa para tudo que precisei.

Ao Alexander Ricardo, pessoa com quem amo partilhar a vida por toda ajuda, companheirismo e paciência.

A Universidade de Brasília, o Instituto de Biologia, e o Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde pela oportunidade e suporte a mim proporcionados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma maneira me ajudaram e me incentivaram, para que a realização e conclusão deste trabalho fosse possível.

Agradeço imensamente a todos!

## SÚMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e a cromoblastomicose	1
1.1.1. Características morfológicas de <i>F. pedrosoi</i>	1
1.1.2. Fatores de virulência de <i>Fp</i>	3
1.1.3. A doença cromoblastomicose	5
1.2. Métodos de transformação genética em fungos	9
1.2.1. Uso de marcadores seletivos nos sistemas de transformação genética	18
1.2.2. Aplicação dos métodos de transformação genética	20
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	22
<b>3. OBJETIVOS</b>	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	24
4.1. Linhagens, cultivo e manutenção de <i>F. pedrosoi</i>	24
4.2. Testes de susceptibilidade aos antibióticos usados como marcadores dominantes seletivos	24
4.3. Construção do cassete de resistência a higromicina b	24
4.4. Construção plasmídeo para transformação via <i>Agrobacterium</i> contendo cassete de resistência a Higromicina B	27
4.5. Construção cassete de resistência à Neomicina	31
4.6. Construção cassete de resistência à Nourseotricina	32
4.7. Extração DNA plasmidial	34
4.8. Transformação biobalística	35
4.8.1. Inóculo de <i>F. pedrosoi</i>	35
4.8.2. Esterilização das partículas de tungstênio	35

4.8.3. Precipitação do DNA nas partículas de tungstênio	36
4.8.4. Procedimento para bombardeamento das placas e seleção dos transformantes	36
4.9. Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	37
4.10. Teste de estabilidade mitótica	38
4.11. Extração de DNA genômico de <i>F. pedrosoi</i>	38
4.12. PCR de confirmação dos mutantes de <i>F. pedrosoi</i>	38
4.13. Confirmação do número de integrações por Southern blot	39
4.14. Obtenção dos mutantes que expressam GFP de <i>F. pedrosoi</i>	40
4.15. Oligonucleotídeos usados neste trabalho	40
4.16. Análises estatísticas	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
5.1. Susceptibilidade aos antibióticos usados como marcadores de seleção dominantes em fungos	42
5.2. Construção dos cassetes de resistência às drogas Higromicina B, Neomicina e Nourseotricina para transformação genética de <i>F. pedrosoi</i>	43
5.2.1. Obtenção do cassete hygR	43
5.2.2. Construção dos cassetes de resistência a Nourseotricina e Neomicina	45
5.2.3. Construção do plasmídeo contendo cassete <i>Pgapdh::hph::Fp<trpc< i=""> para transformação via <i>Agrobacterium</i></trpc<></i>	47
5.3. Avaliação dos parâmetros que podem afetar biobalística e obtenção dos transformantes resistentes a Higromicina B	48
5.4. Uso de Neomicina e Nourseotricina como marcadores de seleção dominantes no sistema de transformação genética por biobalística	53
5.5. Obtenção do mutante GFP de <i>F. pedrosoi</i>	57

5.6. Avaliação dos parâmetros do sistema de transformação por <i>Agrobacterium</i> e obtenção dos transformantes resistentes à Higromicina B	58
5.7. Estimativa do número de integrações por Southern blot	66
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	69
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Morfologia de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	1
<b>Figura 2:</b> Distribuição global de cromoblastomicose baseado em casos relatados	8
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do plasmídeo pAN7.1 utilizado como molde para amplificação do gene de resistência a Higromicina B	26
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do plasmídeo pBluescript KS + utilizado para recombinação do cassete de resistência a Higromicina B construído neste trabalho	26
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da construção do cassete de resistência a Higromicina B	27
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da construção do plasmídeo pFphph obtido neste trabalho	27
<b>Figura 7:</b> Etapas da construção do plasmídeo pPZPhphFp obtido neste trabalho para transformação genética via <i>Agrobacterium</i>	30
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da construção do cassete de resistência à Neomicina	32
<b>Figura 9:</b> Etapas da construção do plasmídeo pFpNEO obtido neste trabalho	32
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática da construção do cassete de resistência à Nourseotricina	33
<b>Figura 11:</b> Etapas da construção do plasmídeo pFpNAT obtido neste trabalho	34
<b>Figura 12:</b> Teste de susceptibilidade de <i>F. pedrosoi</i> CBS 271.37 a Neomicina, Nourseotricina e Higromicina B	42
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática do promotor <i>gapdh</i> de <i>F. pedrosoi</i> contendo a combinação dos potenciais elementos canônicos encontrados em promotores de eucariotos que se ligam a fatores transcricionais identificados pelo programa YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor	44
<b>Figura 14:</b> Resultado das etapas de construção do cassete de resistência a <i>hygR</i>	45
<b>Figura 15:</b> Resultado das etapas de construção do cassete de resistência a Nourseotricina	46
<b>Figura 16:</b> Resultado das etapas de construção do cassete de resistência à Neomicina	46

<b>Figura 17:</b> Resultado das etapas de construção do plasmídeo pPZPhphFp para transformação genética via <i>Agrobacterium</i> contendo cassete que confere resistência a Higromicina B	47
<b>Figura 18:</b> Eficiência da transformação biobalística em <i>F. pedrosoi</i> com os plasmídeos pFPhph e pAN7.1 em função das condições testadas	50
<b>Figura 19:</b> Mutantes de <i>F. pedrosoi</i> transformados por biobalística com plasmídeo pFPhph após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo	52
<b>Figura 20:</b> Confirmação da presença do gene de resistência à Higromicina B nos transformantes estáveis de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por biobalística de pFPhph	53
<b>Figura 21:</b> Mutantes de <i>F. pedrosoi</i> transformados por biobalística com plasmídeo pFPNAT após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo	55
<b>Figura 22:</b> Confirmação da presença do gene de resistência à Nourseotricina nos transformantes estáveis de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por biobalística de pFPNAT	55
<b>Figura 23:</b> Mutantes de <i>F. pedrosoi</i> transformados por biobalística com plasmídeo pFPNEO após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo	56
<b>Figura 24:</b> Confirmação da presença do gene de resistência à Neomicina nos transformantes estáveis de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por biobalística de pFPNEO	56
<b>Figura 25:</b> Obtenção dos transformantes que expressam GFP de <i>F. pedrosoi</i> utilizando o vetor gGFP	58
<b>Figura 26:</b> Número médio de transformantes de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por transformação via <i>Agrobacterium</i> .	60
<b>Figura 27:</b> Número de transformantes de <i>Agrobacterium</i> obtidos com plasmídeo pAD1625 em função dos tempos de co-cultivo 48 e 72h	61
<b>Figura 28:</b> Mutantes de <i>F. pedrosoi</i> transformados por <i>Agrobacterium</i> com plasmídeo pPZPHphFp e pAD1625 após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo	63
<b>Figura 29:</b> Confirmação da presença do gene de resistência à Higromicina B nos transformantes de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por <i>Agrobacterium</i> com pAD1625 e pPZPhphFp	64
<b>Figura 30:</b> Estimativa do número de cópias do gene <i>hph</i> no genoma dos transformantes de <i>F. pedrosoi</i> por Southern blot	67

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Fungos filamentosos em que foram utilizados conídios para transformação genética por Biobalística	12
<b>Tabela 2.</b> Fungos filamentosos em que foram utilizados esporos para transformação genética por <i>Agrobacterium</i>	14
<b>Tabela 3.</b> Tabela mostrando as vantagens e desvantagens das técnicas mais utilizadas para transformação genética em fungos	17
<b>Tabela 4.</b> Tabela de Oligonucleotídeos	40
<b>Tabela 5.</b> Número de transformantes de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por biobalística por $\mu\text{g}$ de DNA em função dos parâmetros avaliados	50
<b>Tabela 6.</b> Número de transformantes de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por <i>Agrobacterium</i> por $10^8$ células após 48h de co-cultivo	60
<b>Tabela 7.</b> Número de transformantes de <i>F. pedrosoi</i> obtidos por <i>Agrobacterium</i> por $10^6$ células em função dos parâmetros avaliados	61



**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

5-FOA-ácido 5-fluoroorotico  
cm- centímetros  
AMPc – monofosfato cíclico de adenosina  
CBM– cromoblastomicose  
Fp– *Fonsecaea pedrosoi*  
GFP – proteína verde fluorescente  
Hph – Higromicina fosfotransferase  
Hyg – Higromicina B  
M – Molar  
NaCl- Cloreto de sódio  
Nat- Nourseotricina  
Neo- Neomicina ou G418  
min. - minutos  
ORF – fase de leitura aberta do DNA  
PCR – reação de polimerização em cadeia  
rpm – rotações por minuto  
UV – ultravioleta  
Hz - Hertz

## RESUMO

*Fonsecaea pedrosoi*, um fungo filamentosos pigmentado devido à produção de melanina, é o principal agente etiológico da Cromoblastomicose (CBM), uma doença com distribuição mundial, mas predominante em países tropicais e subtropicais. A biobalística é uma técnica amplamente utilizada para a direta entrega de material genético em células e tecidos intactos, pelo bombardeamento de partículas. Outro método bem estabelecido numa variedade de fungos é a transformação mediada por *Agrobacterium*, que consiste na transferência de um T-DNA da bactéria para a célula-alvo. Em *F. pedrosoi* não há relatos de protocolos estabelecidos para transformação genética, por isso a utilização de qualquer método requer otimização dos parâmetros. Neste estudo, foi utilizada a cepa CBS 271.37 de *F. pedrosoi* para otimizar o bombardeamento de partículas, e transformação mediada por *Agrobacterium*. Além disto foram construídos vetores contendo marca de resistência à Higromicina B, Nourseotricina e Neomicina. O plasmídeo gGFP contendo o gene da proteína fluorescente GFP, também foi inserido por biobalística em *F. pedrosoi* para gerar transformantes verde fluorescentes que podem servir como linhagens repórter. Os transformantes obtidos a partir dos vetores contendo as marcas de resistência aos antibióticos foram avaliados quanto à estabilidade mitótica e a presença dos genes de resistência, confirmada por PCR. As condições testadas para biobalística, a distância das partículas às células alvo (6 e 9 cm) e o tempo de recuperação das células em meio não seletivo (24 e 48h), não apresentaram diferença significativa após análises estatísticas. Apesar disto, foi possível observar que um disparo de seis centímetros de distância e um tempo de incubação em meio não seletivo por 24 horas para recuperação das células foi o que proporcionou um maior número de transformantes (37 transformantes/ $\mu\text{g}$  DNA para o plasmídeo construído neste trabalho, e 45 transformantes/ $\mu\text{g}$  DNA para o plasmídeo pAN7.1). Nos experimentos com *Agrobacterium* a proporção de co-cultivo bactéria: fungo de 10:1  $\times 10^8$  com tempo de incubação por 72 horas é o que proporciona maior número de transformantes (209 transformantes para plasmídeo pAD1625). Foram selecionados aleatoriamente transformantes resistentes a Higromicina B obtidos por ambas as técnicas para estimar o número de integrações de *hph* no genoma por Southern blot. Os dados mostraram que a utilização de biobalística para a transformação genética de *F. pedrosoi* é eficaz, bem como aquela mediada por *Agrobacterium*. Esta é a primeira vez que uma cepa de *Fonsecaea* foi geneticamente transformada e estes resultados abrem novas vias para melhor compreender a patobiologia do fungo usando estudos de função gênica.

**Palavras-chaves:** *Fonsecaea*, transformação genética, biobalística, *Agrobacterium*.

## ABSTRACT

*Fonsecaea pedrosoi*, a pigmented filamentous fungus due to the production of melanin, is the main etiological agent of Chromoblastomycosis (CBM), a disease with a worldwide distribution, but predominant in tropical and subtropical countries. Biolistics is a widely used technique for the direct delivery of genetic material to intact cells and tissues by the bombardment of particles. Another well-established method in a variety of fungi is *Agrobacterium*-mediated transformation, which involves the transfer of a T-DNA from the bacterium to the target cell. There are no reports for *F. pedrosoi* of established protocols for genetic transformation, and then the use of any method requires the optimization of physical and biological parameters. In this study, *F. pedrosoi* strain CBS 271.37 was used to optimize particle bombardment, and *Agrobacterium*-mediated transformation. In addition, vectors containing resistance to HygRomycin B, Nourseotricina and Neomycin were constructed. The gGFP plasmid containing the GFP fluorescent protein gene was also inserted by biolistics in *F. pedrosoi* to generate fluorescent green transformants that can serve as reporter strains. Transformants obtained after plasmids bombardment were evaluated for mitotic stability and the insertion of resistance genes was confirmed by PCR. The conditions tested for biolistics, distance of the particles to the target cells (6 and 9 cm) and time of recovery of the cells in nonselective medium (24 and 48h), did not present significant difference after statistical analyzes. In spite of this, it was possible to observe that six centimeters of distance and an incubation time of 24 hours in non-selective medium for recovery of the cells were the conditions that provided the highest number of transformants (37 transformants / $\mu\text{g}$  DNA for the plasmid constructed in this work, and 45 transformants / $\mu\text{g}$  DNA for plasmid pAN7.1). In the experiments with *Agrobacterium* the use of a bacterial: fungus co-culture ratio of 10:  $1 \times 10^8$  for 72 hours provided the largest number of transformants (209 transformants for plasmid pAD1625). HygRomycin B resistant transformants were random selected from both methods to estimate the number of integrations of *hph* into the genome by the Southern blot. The data showed that the use of biolistics for the genetic transformation of conidia of *F. pedrosoi* is effective, as well as that mediated by *Agrobacterium*. This is the first time that a *Fonsecaea* strain has been genetically modified and these results open new avenues to better understand fungal pathobiology using gene function studies.

**Key words:** *Fonsecaea*, genetic transformation, biolistics, *Agrobacterium*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Fonsecaea pedrosoi* e a cromoblastomicose

#### 1.1.1. Características morfológicas de *F. pedrosoi*

*Fonsecaea pedrosoi* (*Fp*), agente causador da Cromoblastomicose (CBM) em humanos, é um fungo dimórfico, saprófito e filamentoso, possui hifas e conídios escuros com colônias de aspecto aveludado (Figura 1) (Franzen *et al.*, 2008), também pode ser conhecido como fungo negro devido à produção de melanina, que forma uma espessa camada em sua parede celular. Pode ser encontrado em solos de áreas tropicais e subtropicais e habitar plantas e matérias orgânicas em decomposição (Cunha *et al.*, 2010).

Salgado *et al.*, (2004) relatou a presença do fungo nos espinhos da planta tropical *Mimosa pudica*, que é considerada uma fonte natural da CBM. *F. pedrosoi* possui um ciclo de vida que abrange distintos estágios morfológicos, que compreendem os conídios, micélio (formas infectantes) e corpos escleróticos (forma parasitária, também chamados de células escleróticas ou muriformes). Estudos relatam que os fatores que desencadeiam o processo de transição dimórfica de micélio para células escleróticas, principalmente na infecção ao hospedeiro são temperatura, nutrientes e condições aeróbicas (Szaniszlo *et al.*, 1983; Van Burik & Magee, 2001).

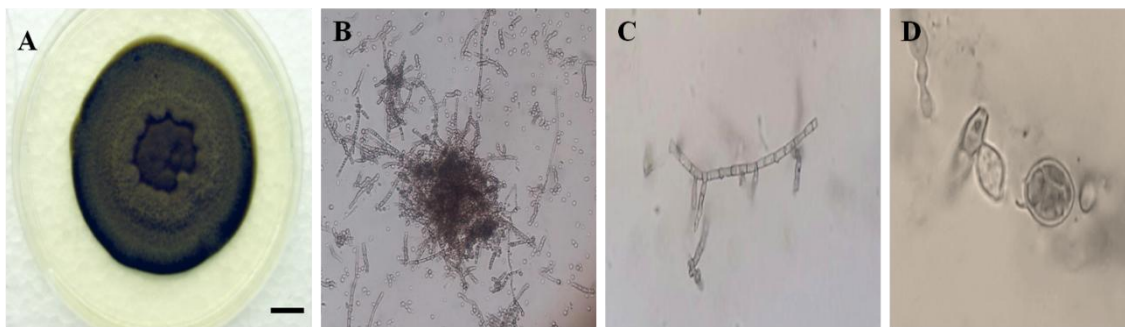


Figura 1: Morfologia de *Fonsecaea pedrosoi*: (A) colônia vista de forma macroscópica (Yamano, 2008), (B e C) hifas de *Fp* e (D) Células muriformes de *Fp* (Foto de células muriformes cedidas pelo grupo do Laboratório de Imunologia Aplicada-LIA-UNB).

As células escleróticas que são consideradas a forma patogênica do fungo, são estruturas altamente resistentes e embora a sua morfologia seja conhecida, sua fisiologia é obscura, principalmente porque esta forma é muito difícil de ser induzida em meios de cultura tradicionais e geralmente não é obtida em quantidades suficientes de tecidos dos

hospedeiros infectados. Vários estudos mostraram que baixo pH e a privação de cálcio parecem ser importantes para induzir a formação dessas células a partir de conídios fúngicos (Silva *et al.*, 2002) *in vitro*. Trabalhos como o da Silva *et al.*, (2002), demonstram que o uso de propranolol induz a formação *in vitro* de células escleróticas muito semelhantes quanto à morfologia às aquelas encontradas nas lesões dos pacientes. Mendoza *et al.*, (1993), observou que a adição de pequenas quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  e do quelante EGTA às hifas de *C. carrionii* e *F. pedrosoi* presentes em meio basal, pH 2,5, gerou a transformação destes filamentos em grande número de células escleróticas quando incubados a 25 ou 37 °C. Embora algumas dessas formas escleróticas tenham sido observadas como estruturas desarticuladas, a maioria permaneceu ligadas às hifas. Além disso, independentemente da espécie envolvida, as células escleróticas produzidas nessas condições, foram geralmente caracterizadas por suas paredes celulares relativamente finas.

A privação de  $\text{Ca}^{2+}$  pode regular a expressão fenotípica desses fungos *in vivo*. Este cenário é altamente plausível porque muitas atividades imunofisiológicas de células inflamatórias e mecanismos relacionados à formação de granulomas durante a infecção requerem  $\text{Ca}^{2+}$ , por exemplo, o  $\text{Ca}^{2+}$  é necessário para a regulação da fagocitose em macrófagos, degranulação de mastócitos e para quase todos os processos inflamatórios. Assim, baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser frequentemente encontradas em tecidos infectados. Os estudos sugerem que, após a entrada de fungos dematiáceos no tecido, diferentes níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  seriam necessários para diferentes cepas e espécies desses fungos proliferar ou alternar para um fenótipo diferente, particularmente durante os estágios iniciais da infecção. Isto sustenta a hipótese de que as atividades imunofisiológicas e outras doenças inflamatórias podem atuar como desencadeantes transitórios ou prolongados na conversão de hifas ou conídios de fungos cromoblastomicóticos em células escleróticas *in vivo* (Mendoza *et al.*, 1993).

Outras condições *in vitro* podem induzir a diferenciação de *Fonsecaea* em células escleróticas. Da Silva *et al.*, (2008), reportou em seu estudo dois meios de cultura produzidos a partir do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do fruto do pessegueiro (*Bactris gasipaes*), que induzem após 48h de cultivo, a diferenciação de conídios em células escleróticas muito semelhantes às encontradas em lesões de pacientes, com divisão multiseptada, uma parede muito grossa e uma cor acastanhada. Além disto, estes autores observaram que durante o processo de diferenciação de *F.*

*pedrosoi*, a parede celular conidial se rompe em um ponto e uma nova célula esclerótica é formada pela expansão do citoplasma previamente contido na parede celular do conídio (Da Silva *et al.*, 2008).

### **1.1.2. Fatores de virulência de *Fp*.**

A melanina é o fator de virulência mais estudado até o momento atribuído a *F. pedrosoi*, é produzida no citoplasma, excretada e depositada na parede celular, interagindo com carboidratos, lipídeos e proteínas formando assim um complexo melanínico. Em *F. pedrosoi*, a melanina é armazenada em vesículas intracelulares, denominadas melanosomas. Neste fungo, a síntese de melanina dentro dos melanosomas começa com uma formação de matriz fibrilar, que apresenta características morfológicas e estruturais semelhantes aos melanosomas de células de anfíbios e mamíferos (Frazen *et al.*, 2008).

Os grânulos de melanina se depositam na parede celular formando camadas concêntricas na parede celular (Franzen *et al.*, 2008), através de ligações com outros componentes como a quitina. A redução de poros propiciada pela melanização, juntamente com as propriedades absorptivas da melanina, podem explicar o porquê das células melanizadas de *F. pedrosoi* apresentam maior resistência às drogas antifúngicas em comparação a fungos deficientes desse polímero (Eisenman *et al.*, 2005; Cunha, 2008).

A melanina não é crucial ao crescimento e morfogênese fúngica, mas está diretamente relacionada à sobrevivência e à virulência em modelo animal (Watanabe *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2001, Shimizu *et al.*, 2014). É um pigmento ubíquo na natureza, presente em todos os reinos biológicos, que proporciona uma vasta variedade de funções, como defesa contra o estresse ambiental, à radiação ultravioleta, às radiações ionizantes e aos agentes oxidantes (Eisenman & Casadevall, 2012).

A melanina está consistentemente presente nos agentes causadores da cromoblastomicose (Schnitzler *et al.*, 1999, Kogej *et al.* 2004, Santos *et al.*, 2007, Thornton *et al.*, 2015), e sua produção deriva de vias metabólicas que promovem polimerização oxidativa de precursores fenólicos (Nosanchuk & Casadevall, 2003), gerando polímeros de alta massa molecular, com alta termoestabilidade e carregados negativamente (White, 1958; Eisenman & Casadevall, 2012).

Três vias diferentes produzem melanina: a via DHN-melanina, a via DOPA-melanina e a via de degradação da L-tirosina (Langfelder *et al.*, 2003). A via biossintética de DHN melanina é a via mais bem caracterizada em fungos e a principal responsável pela síntese deste pigmento em *F. pedrosoi* (Li *et al.*, 2001). Esta via se inicia com a oxidação dos precursores acetil-CoA ou malonil-CoA catalisada pela enzima PKS, formando o 1, 3, 6, 8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN). Esta etapa é seguida por várias reações de redução e desidratação que finaliza com a formação do monômero 1,8- dihidroxinaftaleno (DHN), que se auto-polimeriza promovendo a constituição da melanina. Diferentemente da via L-DOPA, que exige um substrato exógeno (e.g. L-DOPA) ao fungo, a via DHN é produzida endogenamente. O triciclazol, inibidor da síntese de DHN-melanina tem sido amplamente utilizado para estudo do papel deste pigmento produzido por *F. pedrosoi* (Tokousbalides *et al.*, 1979; Cunha *et al.*, 2005; Franzen *et al.*, 2006; Revankar & Sutton, 2010; Eisenman & Casadevall, 2012).

Dentre as funções desempenhadas pela melanina do *F. pedrosoi* que a tornam um fator de virulência incluem: inibição da fagocitose (Cunha *et al.*, 2005), mascaramento de componentes antigênicos como monohexosilceramidas, que induzem a produção de anticorpos microbicidas (Nimrichter *et al.*, 2004, 2005), resistência à eliminação por macrófagos (Cunha *et al.*, 2005), proteção contra o estresse oxidativo de macrófagos, resistência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sequestro de óxido nítrico e inibição da expressão da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (Bocca *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Recentemente foi obtido um mutante espontâneo albino de *F. monophora*, a partir de sub-cultivos de uma cepa isolada de lesões de um paciente da China (Sun *et al.*, 2011). Este mutante mostrou-se sensível a fatores de estresse ambiental como temperatura, pH, radiação UV e estresse oxidativo. Estudos comparativos entre a cepa albina e a selvagem mostraram que a cepa melanizada inibiu a produção de óxido nítrico e citocinas TH1 de macrófagos murinos, o que aumentou a persistência do fungo no tecido (Zhang *et al.*, 2013).

A capacidade de interagir com células hospedeiras e a produção de enzimas hidrolíticas como proteases e lipases são consideradas importantes mecanismos de virulência de patógenos fúngicos. Alguns trabalhos relatam o envolvimento destas

enzimas na patogenicidade de *F. pedrosoi* (Palmeira *et al.*, 2006). No que diz respeito às enzimas proteolíticas, um grupo de pesquisa demonstrou que tanto o conídio e quanto o micélio de *F. pedrosoi* são capazes de secretar proteases do tipo aspartil no ambiente extracelular, para hidrolisar vários substratos proteínáceos, como proteínas séricas (albumina, imunoglobulina G e fibrinogênio) e componentes da matriz extracelular (Fibronectina, laminina e colágeno tipo I), favorecendo a disseminação do fungo dentro do hospedeiro (Palmeira *et al.*, 2005).

As fosfolipases em geral catalisam a hidrólise de fosfolípidos, que são componentes principais de todas as membranas celulares, facilitando também a invasão de fungos (Palmeira *et al.*, 2005; Ghannoum., 2000). O papel das lipases em fungos capazes de causar micoses cutâneas e subcutâneas está relacionado à hidrólise de gorduras nos tecidos subcutâneos para que os resíduos de ácidos graxos sejam utilizados como fonte de nutrientes pelo fungo invasor. A virulência fúngica é uma propriedade multifatorial dependente de várias características que favorecem adesão às células hospedeiras, invasão dos tecidos e evasão da resposta imune, sendo que a produção de enzimas hidrolíticas, como proteases e lipases são de extrema relevância na patogênese. Trabalhos recentes (Palmeira *et al.*, 2005; 2006; 2010) demonstram que *F. pedrosoi* apresenta níveis elevados de atividade proteolítica extracelular, sugerindo que a produção de proteases de tipo aspartil pode ser estimulada pela interação com o hospedeiro. Por comparação com outros agentes patogênicos fúngicos humanos, Palmeira *et al.*, (2010) sugerem que a atividade de fosfolipase e esterase em *F. pedrosoi* contribui para adesão, penetração e nutrição no hospedeiro, durante o curso da cromoblastomicose.

### **1.1.3. A doença Cromoblastomicose**

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica, granulomatosa e supurativa que acomete a pele do tecido subcutâneo de indivíduos infectados por fungos dos gêneros *Phialophora*, *Cladophialophora*, *Rhinocladiella* e *Fonsecaea*. O gênero *Fonsecaea* possui quatro espécies que causam CBM: *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pedrosoi* e *F. pugnacius*, sendo que o *F. pedrosoi* é o principal agente etiológico. Esta doença também conhecida como dermatite verrucosa caracteriza-se pelo surgimento de lesões escamativas (López *et al.*, 2007), localizadas predominantemente nos membros inferiores (Silva *et al.*, 1998). É uma doença considerada ocupacional, pois geralmente



afeta trabalhadores rurais que não estão protegidos adequadamente quando manejam o solo e vegetais (Salgado *et al.*, 2004).

A infecção se inicia com a implantação por meio traumático dos conídios ou fragmentos de hifas no tecido subcutâneo, produzindo então lesões iniciais que consistem em pápulas ou nódulos que se tornam verrucosas. Dentro do hospedeiro, os conídios se diferenciam em células escleróticas e/ ou células muriformes (Alviano *et al.*, 2004). Além destas células, observa-se nas lesões alta frequência de células do sistema imune que não se diferenciam em células efetoras da resposta imunológica (Santos *et al.*, 2007; Xi *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010). No geral as lesões de cromoblastomicose são localizadas e restritas ao tecido subcutâneo, porém há relatos de disseminação hematogênica; inclusive já foram relatados casos de abscessos cerebrais de *F. pedrosoi* (Bonifaz *et al.*, 2001; Lupi *et al.*, 2005; McGinnis *et al.*, 1983; Al-Hedaithy *et al.*, 1988; Santos *et al.*, 1995; Nobrega *et al.*, 2003; Saberi *et al.*, 2003).

O período de incubação pode levar anos e progressão das lesões é lenta, manifestando-se como nódulos, verrugas, tumores, placas e cicatrizes teciduais (Carrión, 1950; Queiroz-Telles, 2015). Há participação de infiltrados inflamatórios ricos em granulócitos, principalmente neutrófilos. Macrófagos também são regularmente observados e se apresentam em diferentes graus de maturação e ativação, ocasionalmente formando células gigantes multinucleadas. (Esterre *et al.*, 1993; Rozental *et al.*, 1996).

Cardona- Castro & Agudelo-Florez, (1999) desenvolveram um modelo murino de cromoblastomicose crônica utilizando camundongos imunocompetentes BALB/c inoculados intraperitonealmente, com uma cepa de *F. pedrosoi* isolada da perna de um paciente. Este trabalho foi o primeiro a demonstrar a doença progressiva e crônica com a transformação das hifas nas células escleróticas em camundongos imunocompetentes.

Diferentes morfotipos de fungos podem ser associados a diferentes padrões de resposta imune e ao estabelecimento bem-sucedido de infecção fúngica em hospedeiros de mamíferos. Além disso, a capacidade de existir em diferentes formas e de mudar reversivelmente de uma para a outra durante a infecção é um importante fator de virulência, que permite a sobrevivência e a persistência dos fungos no hospedeiro. Os agentes etiológicos de CBM exibem alterações morfológicas e bioquímicas ao se diferenciarem de células saprófitas (células de hifas e conídios) para as formas

parasitárias (células muriformes) que influenciam a patogênese. Em um estudo realizado recentemente em camundongos infectados com conídios (Siqueira *et al.*, 2017), foi visto que estas células de *F. pedrosoi* são incapazes de promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ . Além disto, foi demonstrado que tanto as hifas como as células escleróticas de *F. pedrosoi* são capazes de estabelecer CBM murina, uma vez que os animais infectados com estes tipos celulares apresentaram alterações histopatológicas semelhantes às encontradas em seres humanos. No entanto os camundongos que foram infectados com conídios de *F. pedrosoi* não atingiram a fase crônica da doença. Além disso, a presença de hifas e especialmente de células muriformes, mas não de conídios, está correlacionada com a produção intensa de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* (Siqueira *et al.*, 2017).

A cromoblastomicose tem distribuição mundial (Figura 2), com predominância em países tropicais e subtropicais (Bonifaz *et al.*, 2001; Najafzadeh, 2011), e alta incidência no Brasil, México, Venezuela, Japão, e Madagascar, sendo que este último apresenta maior número de casos da doença (Palmeira *et al.*, 2017). Dos agentes de CBM mais comuns o *C. carrionii* ocorre mais em áreas semi-áridas, enquanto que *F. pedrosoi* está associado a climas úmidos. Assim como a maioria das micoses endêmicas, a CBM não é uma doença notificável, o que dificulta a avaliação precisa da incidência ou prevalência. No Brasil as áreas consideradas endêmicas são Amazônia, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Correia *et al.*, 2010; Matte *et al.*, 1997), sendo a primeira com o maior número de casos relatados.

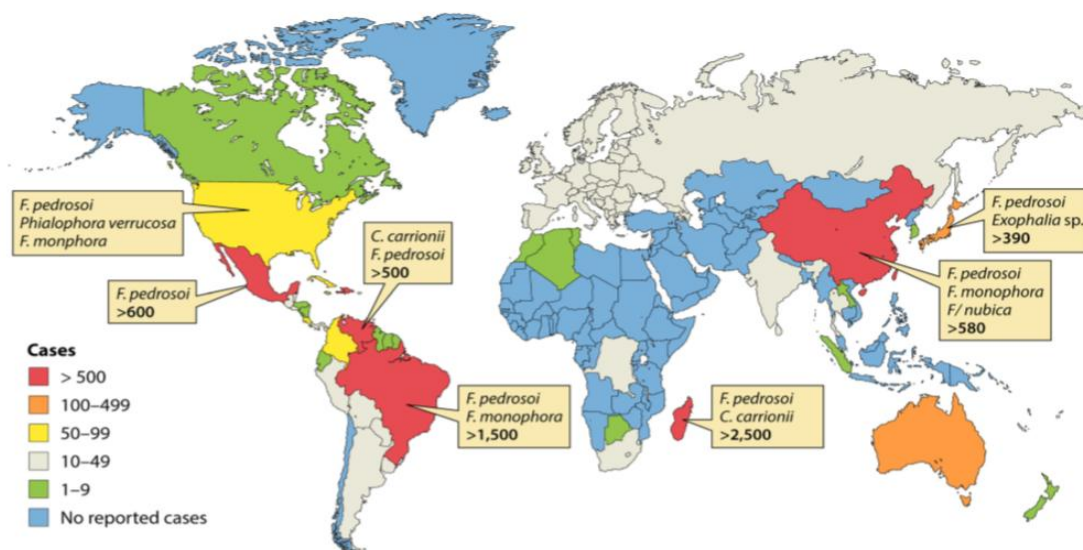


Figura 2: Distribuição global de cromoblastomicose baseada em casos relatados (Queiroz *et al.*, 2017). Os locais em vermelho são onde ocorre o maior número de casos de CBM, pode-se observar um predomínio em países de climas tropicais como Brasil, México, Venezuela, Madagascar e China; em Azul são os locais aonde não há casos reportados da doença.

Segundo estudos epidemiológicos a cromoblastomicose pode afetar indivíduos de qualquer idade, porém é rara na adolescência e mais comum em adultos maiores de 30 anos. A possível explicação para este dado pode ser atribuída à cronicidade da doença, pois o aparecimento dos sintomas pode levar vários anos (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Silva *et al.*, 1999; Brandt & Warnock, 2003). Os pacientes com cromoblastomicose costumam ser de baixa renda e com pouca instrução escolar, o que leva a demora na procura por um serviço médico, agravando as lesões e dificultando o tratamento. O senso do IBGE do ano 2000 estimou que 1 a cada 196 mil habitantes, estava acometido por cromoblastomicose, o que na época correspondia cerca de 163 mil indivíduos com a doença (0,51% da população rural brasileira) no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2006).

O diagnóstico da doença pode ser feito por exame direto e histológico da lesão do paciente (Kwon-Chung & Bennett, 1992), sendo o padrão ouro a detecção das células muriformes (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Brandt & Warnock, 2003; Gimenes *et al.*, 2005; Franzen *et al.*, 2006). O estágio da doença determina o tratamento (Esterre & Queiroz-Telles, 2006) e para isso é analisado o grau e extensão das lesões. No estágio inicial, quando o paciente apresenta lesões pequenas e isoladas, o tratamento é eficaz. Nos estágios crônicos em que as lesões são maiores e com aspecto verrugoso, o

tratamento é feito de forma que visa diminuir a gravidade, e impedir que se tenha uma piora no quadro clínico. Esta micose é uma das mais difíceis de serem tratadas, por ser uma doença de progressão lenta, que desafia os tratamentos usuais e leva a frequentes recidivas (Ameen, 2009). O tratamento com antifúngicos convencionais utiliza itraconazol, terbinafina, anfotericina B e 5-fluorocitosina por um período de seis a doze meses (Bonifaz *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2002; Poirriez *et al.*, 2000), no entanto é pouco eficaz, já que *F. pedrosoi* não responde bem a estas drogas. Assim, muitas vezes opta-se pela remoção das lesões por métodos físicos, como cirurgia, crioterapia ou termoterapia (Ameen, 2009).

A biologia, os fatores de virulência e os mecanismos de patogênese de *F. pedrosoi* ainda são pouco conhecidos. Recentemente foi realizado o sequenciamento genômico de *F. pedrosoi* (Teixeira, *et al.*, 2017). Apesar dos dados genômicos já estarem disponíveis, a avaliação dos genes envolvidos na patobiologia de *F. pedrosoi* é limitada uma vez que até o momento não existe um sistema de transformação genética estabelecida para o estudo de genes específicos do fungo. Diante disto, este trabalho teve como objetivo principal, estabelecer um sistema de transformação genética para *F. pedrosoi*, bem como construir cassetes de resistência a drogas para uso no estudo funcional dos genes envolvidos na virulência, morfogênese e possíveis alvos para drogas.

## **1.2. Métodos de transformação genética em fungos**

Os fungos apresentam uma grande importância dentro da genética, por serem considerados ótimos modelos para estudo de eucariontes e por serem hospedeiros ideais para as técnicas de manipulação de DNA (Esposito, 2004). A tecnologia do DNA recombinante proporciona ferramentas que permitem alterações definidas em um organismo. A transformação genética é o processo de introdução controlada de ácidos nucleicos exógenos em um genoma receptor, sem comprometer a viabilidade das células. Existem vários métodos de transferência de genes, sendo os mais conhecidos: captação de DNA mediada quimicamente, eletroporação, bombardeamento de partículas e por *Agrobacterium* (Perani *et al.*, 1986).

As primeiras transformações de fungos datam de 1973, quando um mutante de *Neurospora crassa* foi transformado para prototrofia com o gene selvagem (Mishra e Tatum, 1973). Contudo, os resultados foram considerados dúbios, devido à baixa

eficiência do processo e à falta de reprodutibilidade. Em fungos filamentosos, as metodologias de transformação utilizadas compreendem a geração de protoplastos, seguida de tratamento químico ou eletroporação, a utilização de conídios intactos para biobalística, e o uso da capacidade natural de transferência de genes da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (dos Reis *et al.*, 2004).

Os primeiros relatos de transformação usando protoplastos são de 1979 em *N. crassa* (Case *et al.*, 1979) e de *Aspergillus nidulans* em 1983 (Tilburn *et al.*, 1983). O protocolo utilizando protoplastos requer tratamento enzimático das células para remoção da parede celular (Bravo *et al.*, 2011). Para que o DNA exógeno seja introduzido é necessária a eletroporação, em que os protoplastos são expostos a curtos pulsos de corrente contínua e alta voltagem (Fromm *et al.*, 1985) ou o emprego de polietilenoglicol (PEG), que em combinação com  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e pH alcalino, promove a absorção do DNA por endocitose (Finer *et al.*, 1996). São várias as desvantagens da utilização deste método, dentre elas o longo e laborioso protocolo enzimático para remoção da parede celular que muitas vezes apresenta baixo rendimento na obtenção de protoplastos, a necessidade de enzimas hidrolíticas, a inserção de alto número de cópias do DNA exógeno no genoma, além do fato de que o tratamento com PEG pode danificar um grande número de células, reduzindo assim a capacidade de regeneração após a transformação genética (Santarém, 2000, Meyer, 2008). Apesar das desvantagens, esta técnica pode ser usada para qualquer tipo de célula fúngica, tais como, esporos, tubos germinativos, hifas e até leveduras.

A eletroporação é o método físico mais comum para a transformação de fungos e consiste na aplicação de um pulso elétrico para induzir permeabilidade celular transitória e, conseqüentemente, absorção de DNA. As células que são expostas a um campo elétrico, sofrem a polarização de componentes estruturais da membrana celular, e quando a tensão aplicada supera um nível limiar, os poros são formados em áreas específicas, permitindo a difusão de moléculas. A metodologia de eletroporação pode ser aplicada tanto em células intactas quanto em protoplastos. É uma técnica popular por ser simples, rápida e eficiente, no entanto, entre as suas desvantagens estão necessidade de se conhecer as características eletrofisiológicas do fungo, a baixa eficiência de transformação genética, a necessidade de equipamentos especiais, e o estabelecimento de protocolos para a regeneração celular após transformação genética (Olmedo-Monfil *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2014).

A biobalística, ou bombardeamento de partículas, é amplamente utilizada para a entrega de material genético diretamente a diferentes tipos de células e tecidos intactos. O método consiste na aceleração de micropartículas de ouro ou tungstênio cobertas com DNA exógeno e direcionadas pelo vácuo para atravessar a parede e membrana celular de forma não letal (Aragão & Brasileiro, 2009). As variáveis de maior efeito sobre a eficiência da transformação incluem o vácuo na câmara de bombardeamento, a distância entre as micropartículas e o alvo, o tamanho das células, a densidade das partículas utilizadas no bombardeamento, e a fonte de energia motriz (Te'o *et al.*, 2002). Uma grande vantagem deste método é que o mesmo não requer pré-tratamento das células e remoção da parede celular. No entanto é necessário equipamento e suprimentos específicos, além do fato que geralmente promove a inserção de múltiplas cópias do DNA exógeno no genoma da célula alvo (Meyer, 2008, Rivera *et al.*, 2014). A tabela 1 apresenta a lista de fungos filamentosos que foram transformados por biobalística usando conídios como células alvo e os principais parâmetros testados.

**Tabela 1: Fungos filamentosos em que foram utilizados conídios para transformação genética por Biobalística.**

Parâmetros avaliados com melhor eficiência									
Espécie	Número de células-alvo	Distância do alvo (cm)	Pressão Hélio (psi)	Conídios germinados ou intactos	Uso de estabilizador osmótico	Tempo de recuperação após tiro (h)	Número de Transformantes obtidos/ $\mu$ g DNA	Marca de seleção	Referência
<i>Aspergillus giganteus</i>	$1,5 \times 10^8$	17,5	1.400	germinados		16-18	2	hygR	Meyer <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus nidulans</i>	$5 \times 10^7$	13	1.300	intactos	1 M sorbitol		81	ArgB	Fungaro <i>et al.</i> , 1995
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	$3 \times 10^7$	6	1.250	intactos			13-17	hygR	Hilber <i>et al.</i> , 1994
<i>Coccidioides immitis</i>	$10^7$	Nd	150	germinados	1 M sorbitol	2	8	hygR	Yu e Cole <i>et al.</i> , 1998
<i>Fusarium oxysporum</i>	nd	Nd	1.350	intactos			45	hygR	Aboul-Soud <i>et al.</i> , 2004
<i>Metarhizium anisopliae</i>	$2 \times 10^7$	Nd	Nd	intactos		18	4-88	Glufosinato de amônio	Inglis <i>et al.</i> , 2000
<i>Mucor circinelloides</i>	$10^7$	8	1.250	intactos			14-380	leuA	Gonzalez-Hernandez <i>et al.</i> , 1997
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	$3 \times 10^7$	13	1.300	intactos		18	140-153	hygR	Chaves Barreto <i>et al.</i> , 1997
<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Gliocladium virens</i>	$10^7$	6	1.200	intactos	0,5M sorbitol + 0,5M manitol	7	600-800	hygR	Lorito <i>et al.</i> , 1993
<i>Trichoderma reesei</i>	$10^7$	6	900	intactos		6	4,3-7,6	hygR	Hazell <i>et al.</i> , 2000

Nd: não descrito

*Agrobacterium* é uma bactéria aeróbia, Gram negativa, que possui forma de bacilo, típica do solo, além disto é o agente etiológico da galha-da-coroa em plantas, caracterizada pelo desenvolvimento de um tumor no local da infecção. A transformação genética mediada por *Agrobacterium* é um método que consiste na transferência de T-DNA (DNA de transferência) que está presente no plasmídeo denominado Ti (*Tumor inducing*), para o genoma da célula alvo (Abuodeh *et al.*, 2000, Brasileiro *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2000). Essa transferência do T-DNA se dá pela ativação dos genes *vir* (de virulência) contidos no plasmídeo Ti em resposta aos compostos fenólicos (como acetoseringona) que são produzidos pelas feridas das plantas para que *Agrobacterium* forme o tubo de conjugação e sensoreie o hospedeiro. O T-DNA é flanqueado por duas sequencias repetitivas de 25 pb em cada lado denominadas bordas direita e esquerda, sendo a primeira essencial para este processo. Originalmente, o T-DNA apresenta genes necessários para a síntese de opinas que são fontes de nitrogênio e carbono para a bactéria.

O emprego da transformação mediada por *A. tumefaciens* foi descrita para fungos filamentosos por De Groot e colaboradores em 1998, e desde então vem sendo utilizada para várias espécies fúngicas. Dentre os parâmetros a serem testados para se obter uma melhor eficiência pode-se incluir a temperatura e o tempo de co-cultivo, a proporção de *Agrobacterium*: fungo, a concentração de acetoseringona e a linhagem de *Agrobacterium*. Atualmente, esta técnica é a mais utilizada para transformação de fungos, uma vez que não necessita equipamentos especiais ou tratamentos enzimáticos para remoção da parede celular e pode ser aplicada para diferentes tipos celulares e fungos de difícil manipulação. Além disto, promove inserção de cópias únicas e estáveis no genoma e favorece integração direcionada a um gene alvo e a recombinação homóloga. Essa metodologia também pode ser empregada como estratégia de mutagênese insercional, pela integração do T-DNA em loci aleatórios no genoma da célula hospedeira. A tabela 2 apresenta a lista de fungos filamentosos que foram transformados por *Agrobacterium* usando conídios como células alvo.



**Tabela 2: Fungos filamentosos em que foram utilizados esporos para transformação genética por *Agrobacterium*.**

Espécie	Linhagem <i>Agrobacterium</i>	Número de células alvo	Número de transformantes obtidos	Marca de seleção	Referência
<i>Ascochyta rabiei</i>	AGL-1	10 <sup>6</sup>	10/ 10 <sup>5</sup>	hygR	White & Chen.,2006
<i>Aspergillus awamori</i>	LBA1100	10 <sup>7</sup>	200/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Michielse <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EHA105	10 <sup>7</sup>	10/ 10 <sup>7</sup>	hygR	Sugui <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus aculeatus</i>	C58C1	10 <sup>7</sup> / 10 <sup>8</sup>	217/ 10 <sup>7</sup>	hygR	Kunitake <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus sojae</i>	LBA4404	10 <sup>5</sup>	40-100/ 10 <sup>5</sup>	Fleomicina	Mora-Lugo <i>et al.</i> , 2014
<i>Botrytis cinérea</i>	LBA1126	10 <sup>6</sup>	15 / 10 <sup>6</sup>	hygR	Rolland <i>et al.</i> , 2003
<i>Beauveria bassiana</i>	AGL-1	10 <sup>5</sup> / 10 <sup>6</sup>	28/ 10 <sup>4</sup> e 96/ 10 <sup>5</sup>	hygR	dos Reis <i>et al.</i> , 2004
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	AGL1	10 <sup>6</sup>	23/ 10 <sup>5</sup>	hygR	Chen <i>et al.</i> ,2016
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	LBA4404	10 <sup>8</sup>	nd	hygR	Zhang <i>et al.</i> ,2011
<i>Colletotrichum graminicola</i>	AGL-1	10 <sup>6</sup>	nd	hygR	Flowers <i>et al.</i> ,2005
<i>Colletotrichum sansevieriae</i>	LBA4404/ GV3101/ GV2260	10 <sup>6</sup>	320/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Nakamura <i>et al.</i> ,2012
<i>Calonectria morganii</i>	LBA1100	10 <sup>6</sup>	nd	hygR	Malonek <i>et al.</i> , 2001
<i>Colletotrichum truncatum</i>	AGL1	10 <sup>6</sup>	nd	hygR	Auyong <i>et al.</i> ,2012
<i>Fusarium oxysporum</i>	AGL-1	10 <sup>6</sup>	300 - 500/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Mullins <i>et al.</i> , 2001
<i>Fusarium oxysporum</i>	LBA4404	10 <sup>6</sup> / 10 <sup>7</sup>	nd	hygR	Islam <i>et al.</i> ,2012
<i>Guignardia citricarpa</i>	LGMF06	10 <sup>6</sup>	nd	Glufosinato de amônio	Figueiredo <i>et al.</i> ,2010
<i>Harpophora oryzae</i>	AGL-1	10 <sup>5</sup> / 10 <sup>6</sup> / 10 <sup>7</sup>	17/ 10 <sup>6</sup>	Sulfonilureia/ hygR	Liu <i>et al.</i> ,2016
<i>Helminthosporium turcicum</i>	AGL-1	10 <sup>4</sup>	30 - 50/ 10 <sup>4</sup>	hygR	Degefu <i>et al.</i> , 2003

<i>Magnaporthe grisea</i>	AGL-1	10 <sup>6</sup>	1.000/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Rho <i>et al.</i> ,2001
<i>Metarhizium anisopliae</i>	AGL-1	10 <sup>8</sup>	17/ 10 <sup>6</sup>	Benomil	Fang <i>et al.</i> ,2006
<i>Metarhizium anisopliae</i>	AGL-1	10 <sup>6</sup>	53/ 10 <sup>5</sup>	Benomil	Duarte <i>et al.</i> ,2007
<i>Mortierella alpina</i>	C58C1	10 <sup>8</sup>	400/ 10 <sup>8</sup>	5-FOA	Ando <i>et al.</i> ,2009
<i>Myceliophthora thermophila</i>	AGL-1	10 <sup>6</sup>	145/ 10 <sup>5</sup>	Fosfinotricina	Xu <i>et al.</i> ,2015
<i>Nomuraea rileyi</i>	GV3101/ AGL-1/ C58/ LBA4404	10 <sup>6</sup>	20 - 40/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Shao <i>et al.</i> ,2015
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	AGL-1	10 <sup>6</sup> / 10 <sup>7</sup> /10 <sup>8</sup>	58/ 10 <sup>5</sup> - 98/ 10 <sup>6</sup> - 169/ 10 <sup>7</sup>	hygR	Lima <i>et al.</i> ,2006
<i>Penicillium digitatum</i>	AGL-1	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>	60/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Wang & Li.,2008
<i>Penicillium marneffeii</i>	LBA4404/EHA105	10 <sup>6</sup>	82/ 10 <sup>5</sup>	Bleomicina	Zhang <i>et al.</i> ,2008
<i>Penicillium marneffeii</i>	AGL1	10 <sup>6</sup>	123/ 10 <sup>4</sup>	Bleomicina	Kummasook <i>et al.</i> ,2010
<i>Penicillium expansum</i>	EHA105	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>	100/ 10 <sup>5</sup>	hygR	Zhang <i>et al.</i> ,2013
<i>Sporothrix schenckii</i>	LBA4404/EHA105/ AGL1	10 <sup>6</sup>	600/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Zhang <i>et al.</i> ,2011
<i>Thielaviopsis basicola</i>	AGL1	10 <sup>6</sup>	nd	hygR	Tzima <i>et al.</i> ,2014
<i>Trichoderma atroviride</i>	LBA1100	10 <sup>6</sup> / 10 <sup>7</sup> / 10 <sup>8</sup>	maior eficiência 10 <sup>7</sup>	hygR	Zeilinger <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichoderma reesei</i>	AGL-1	10 <sup>5</sup> / 10 <sup>6</sup> / 10 <sup>7</sup>	200 - 500/ 10 <sup>7</sup>	hygR	Zhong <i>et al.</i> ,2007
<i>Trichoderma reesei</i>	EH105	10 <sup>5</sup>	10 - 20/ 10 <sup>5</sup>	Uridina	Zhong <i>et al.</i> ,2011
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	EHA105	10 <sup>7</sup>	200/ 10 <sup>7</sup>	hygR	Yamada <i>et al.</i> ,2009
<i>Ustilago scitaminea</i>	AGL1	nd	nd	hygR	Sun <i>et al.</i> ,2014
<i>Valsa Mali</i>	EHA105	10 <sup>6</sup>	150/ 10 <sup>6</sup>	hygR	Hu <i>et al.</i> ,2014

---

Nd: não descrito

Existem outras técnicas utilizadas para transformações genéticas não tão usuais. A agitação das células fúngicas com pérolas de vidro permite a absorção de DNA. É um protocolo simples, rápido e barato, porém pode causar rompimento celular, além de necessitar de suporte osmótico e ter baixa eficiência (Rivera *et al.*, 2014). A infiltração a vácuo é um método auxiliar na transformação por *Agrobacterium*, pois permite a penetração da bactéria nos espaços de ar gerados pela pressão atmosférica negativa causada pelo vácuo (Rivera *et al.*, 2014). O uso de ondas de choque consiste na cavitação acústica para mudar a permeabilidade da membrana e facilitar a absorção de DNA. Dentre as suas vantagens estão o baixo custo, a simplicidade e alta eficiência do protocolo (Rivera *et al.*, 2014).

A transformação mediada por lipossomas consiste na utilização de vesículas lipídicas sintéticas para a entrega de DNA exógeno. Os lipossomas contêm grupos de cabeça hidrofílicos, caudas hidrofóbicas e atingem cargas positivas formando vesículas lipídicas em um ambiente aquoso que atraem as moléculas de DNA negativamente carregadas. Formam-se assim os lipocomplexos que são transfectados na célula alvo por endocitose protegendo o DNA da degradação por nucleases. Esta estratégia apresenta muitas vantagens potenciais em comparação com outros vetores não virais, como sua excelente biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, grande capacidade de carregamento de ácido nucléico e produção em larga escala, além de ser amplamente utilizado para a administração de genes em terapia genética (Chira *et al.*, 2015).

A transformação mediada por nanomateriais vem ganhando reconhecimento como alternativa aos vetores de genes virais devido à sua segurança e baixa imunogenicidade (Chira *et al.*, 2015). Os materiais nanoparticulados protegem o DNA e o entregam nas células alvo (He *et al.*, 2017). Por último, os vetores virais apresentam-se como um meio eficiente para a entrega de genes, no entanto o uso em fungos é mais limitado, devido baixa estabilidade e às ferramentas pouco desenvolvidas disponíveis (He *et al.*, 2017).

Abaixo segue Tabela 3 adaptada de Meyer (2008), com as vantagens e desvantagens das principais técnicas utilizadas para transformação genética de fungos.

**Tabela 3: Tabela mostrando as vantagens e desvantagens das técnicas mais utilizadas para transformação genética em fungos.**

<b>Método</b>	<b>Princípio</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Protoplastos	Degradação da parede celular com enzimas. A absorção de DNA se dá pela adição de PEG e CaCl <sub>2</sub> .	Pode ser usada em diferentes tipos de células (leveduras, esporos e hifas).	Determinado lote de enzima lítica altera taxa de transformação, requer processo de regeneração, o número de inserções no genoma é muitas vezes alto.
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i> carrega dois vetores (o vetor binário contendo o T-DNA, entre as repetições de 24 pb nas bordas e o vetor contendo os genes de virulência importantes para transferência de T-DNA). A transferência de DNA é alcançada durante o co-cultivo de <i>A. tumefaciens</i> com o fungo.	Diferentes tipos de células (leveduras, esporos e hifas) podem ser usados. O número de cópias inseridas no genoma é baixo. Melhora a integração sítio dirigida.	Vários parâmetros durante co-cultivo afetam a taxa de transformação. Protocolo mais demorado do que os outros métodos.
Eletroporação	Permeabilização reversível da membrana induzida por pulsos elétricos para absorção de DNA.	Diferentes tipos de células (leveduras, esporos, tubos germinativos) podem ser usados. Método simples e barato.	Muitas vezes necessita obtenção de protoplastos para tornar as células competentes. Requer equipamento específico.
Biobalística	As partículas (tungstênio, ouro) são revestidas com DNA e são aceleradas em alta velocidade nas células.	As células receptoras podem manter a parede celular (não requer pré-tratamento).	Necessidade de equipamento e insumos especiais.

Modificado de Meyer, 2008.

### 1.2.1. Uso de marcadores seletivos nos sistemas de transformação genética

Independente da metodologia de transformação utilizada, a seleção de linhagens transgênicas é uma das limitações mais importantes. O primeiro caso de transformação genética de fungos foi no início dos anos 70, e o modelo fúngico selecionado apresentava um mutante auxotrófico para diferentes compostos como inositol, uracil e leucina, de modo que o rastreamento de linhagens transgênicas se baseava na reversão em relação ao fenótipo do tipo selvagem (Mishra e Tatum, 1973). Existem muitas cepas auxotróficas bem caracterizadas em fungos, mas estão limitadas a algumas espécies. Os mutantes auxotróficos particulares podem ser isolados por seleção positiva usando compostos químicos. As cepas mutantes afetadas nos genes *pyrG* (*A. nidulans*), *pyr4* (*N. crassa*) ou *ura3* (*S. cerevisiae*) que não apresentam atividade de 5'-monofosfato orotidina carboxilase, são capazes de crescer em meio cultura contendo um análogo tóxico do ácido fluoroorótico (5-FOA) (Hynes *et al.*, 1996).

Em *A. nidulans*, o uso de clorato permite a seleção de cepas afetadas na atividade da nitrato redutase, codificada pelo gene *niaD*, e são incapazes de usar nitrato como única fonte de nitrogênio. A pressão seletiva exercida pelo selenato ou fluoroacetato presente em meios de cultura é útil na seleção de mutantes sem atividades de ATP sulfilase ou acetilCoA sintetase. Finalmente, em *A. nidulans*, o uso de fluoracetamida, um análogo tóxico de acetamida, pode afetar o gene *amdS*, tornando os mutantes incapazes de metabolizar a acetamida como fonte única de nitrogênio ou carbono. Como a maioria das espécies fúngicas não metabolizam acetamida, o gene *amdS* torna-se um bom marcador de seleção heteróloga (Olmedo-Monfil *et al.*, 2004).

Hoje em dia, muitos outros genes que conferem resistência a diferentes drogas químicas estão disponíveis como marcadores de seleção dominantes. A principal vantagem no uso de marcadores de seleção que conferem resistência aos antibióticos se deve ao fato de que não é necessário ter conhecimento prévio do genótipo do fungo submetido à transformação genética. Por outro lado, exige a avaliação da concentração do antibiótico necessária para inibir completamente o crescimento da população selvagem. Em alguns casos, os fungos apresentam resistência natural ao antibiótico e, conseqüentemente, é necessária uma alta concentração do composto. No entanto, esse tipo de marcador de seleção representa a melhor escolha quando as cepas auxotróficas não estão disponíveis (Olmedo-Monfil *et al.*, 2004).

A Higromicina B é um antibiótico aminoglicosídeo, ativo contra células procarióticas e eucarióticas. O gene higromicina fosfotransferase de *E. coli* (*hph*) inativa o antibiótico, a Higromicina B, e tem sido efetivo na maioria dos sistemas. Vários vetores estão disponíveis contendo esta marca de seleção, e em 1987, Punt e companheiros desenvolveram o plasmídeo pAN7.1 que contém o cassete de resistência antibiótica original sob o controle do promotor *gpdA* com a sequência de terminação *trpC* de *A. nidulans*. A resistência espontânea à Higromicina B pode complicar o uso deste antibiótico para seleção em algumas espécies de fungos (Moore 2009; Gonzalez *et al.*, 1978).

Nourseotricina (NAT) também é um antibiótico aminoglicosídeo, membro da classe estreptotricina, e inibe a síntese protéica induzindo erros de leitura do RNA. É usado como um marcador de seleção para uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos e células vegetais e é conhecido por não ter efeitos colaterais adversos em células selecionadas positivamente. O gene *nat* que confere resistência a Nourseotricina é derivado de *Streptomyces noursei*, e codifica uma enzima que inativa o antibiótico por acetilação do grupo beta-amino do resíduo beta-lisina. *Nat* é compatível com outros agentes de seleção como Puromicina, Higromicina B, Neomicina, Blastidina e é uma adição valiosa ao repertório de marcadores de seleção (Moore 2009; Kochupurakkal & Iglehart, 2013).

O gene *neo* (resistência à Neomicina) codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, que confere resistência a vários antibióticos aminoglicosídeos, incluindo Canamicina e G418. O gene é amplamente utilizado como marcador seletivo na transformação de organismos diversos como bactérias, leveduras, plantas e animais e codifica enzima que catalisa a transferência do fosfato terminal à droga (Yenofsky *et al.*, 1990). Outros marcadores utilizados são também a fosfinotricina, que é o produto de degradação ativa do herbicida, bialafos, e inibe a glutamina sintase em organismos suscetíveis. A resistência pode ser conferida pelo gene da *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. A fleomicina e a zeocina são membros da família bleomicina de antibióticos antitumorais que na presença de íons metálicos divalentes intercalam ao DNA e promovem quebra da fita dupla mediada por radicais livres (Moore, 2009).

### 1.2.2. Aplicação dos métodos de transformação genética

Dentre as aplicações das transformações genéticas estão: a inativação de genes, os estudos de regulação da expressão gênica e o melhoramento de organismos. O processo de identificação da função de um gene em um organismo após o estabelecimento de sua sequência de DNA é conhecida como genética reversa, para a qual uma série de métodos têm sido explorados, esses métodos incluem: recombinação homóloga, mutagênese insercional, silenciamento de genes por RNA interferente ou mais recentemente inativação gênica por sistema CRISP/Cas9 (Olmedo-Monfil *et al.*, 2004; Jinek *et al.*, 2012; Doench *et al.*, 2014).

O estudo de regulação de genes associado ao uso de fusões de genes a um gene repórter em combinação com o sistema de transformação adequado permite que a expressão gênica seja monitorada *in vivo* (Zhou *et al.*, 2011). Desta forma, os genes podem ser reconhecidos com base no seu padrão de expressão ao longo do tempo ou sob uma condição selecionada. Vários genes repórter já foram aplicados com sucesso em fungos, a proteína fluorescente verde (GFP) da água-viva *Aequorea victoria* provou ser uma ferramenta poderosa em estudos de transformação genética fúngica, embora tenham sido necessárias modificações na sequência original para obter versões de GFP que fluorescem eficientemente em células de fungos (Olmedo-Monfil *et al.*, 2004). Trabalhos como o de Rajasekaran *et al.* (2008), usaram GFP para monitorar o crescimento de *Aspergillus flavus* no algodão. O GFP emitido permitiu identificar e monitorar tecidos vegetais específicos colonizados pelo fungo; além de detectar as linhagens de algodão com maior resistência à colonização fúngica. Outros estudos como o de Bretz *et al.*, (2008), usaram uma cepa que expressa GFP em *A. fumigatus* para monitorar e avaliar eventos iniciais da infecção pulmonar em camundongos.

A utilização de cepas reporter, não só com proteínas fluorescentes como GFP, mas também com outros possíveis marcadores como luciferase de vagalume (*Photinus pyralis*) é de grande relevância para o estudo da biologia das células (Hakkila *et al.*, 2002). Há também a proteína mCherry que produz fluorescência vermelha, originalmente derivada de *Dicosoma sp.*, e conhecida como melhor biomarcador dentre os monomeros vermelhos (Shaner *et al.*, 2004). Há trabalhos como o de Figueiredo (2013), que utilizaram mCherry para analisar *in vivo* (através de inoculação intranasal em camundongos) a infecção causada por *Cryptococcus*, mostrando assim a importância

de linhagens reporter no estudo de mecanismos de patogenicidade. Outra proteína muito utilizada é a DsRed, que também emite fluorescência vermelha, é originária do coral *Dicosoma sp.*, e se diferencia de outras proteínas como GFP e mCherry, por necessitar de um comprimento de onda maior para ser visualizada ( Cubitt *et al.*, 1995).



## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando que até o presente momento não existem ferramentas moleculares para a manipulação genética dos principais agentes causadores da cromoblastomicose, uma micose de grande relevância no Brasil e em vários outros países do mundo, a transformação genética em *Fonsecaea* tem grande importância para o estudo de sua biologia e seus fatores de virulência, uma vez que já existe disponível o genoma deste fungo. Neste trabalho foi utilizado *F.pedrosoi*, o principal agente causador desta doença para padronização de dois métodos de transformação genética: bombardeamento de partículas, e a transformação mediada por *Agrobacterium*. A otimização de protocolos de transformações genética com *F. pedrosoi* será útil para desenvolver estudos funcionais de genes, que poderá auxiliar no desenvolvimento de futuras estratégias para o tratamento e entendimento da cromoblastomicose.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Padronizar as técnicas de transformação genética para *F. pedrosoi*.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a susceptibilidade de *F. pedrosoi* aos antibióticos usados como marcadores seletivos para manipulação genética em fungos.
2. Construir os cassetes de seleção para resistência a Neomicina, Nourseotricina e Higromicina B.
3. Transformar *F. pedrosoi* por biobalística e *Agrobacterium* e avaliar os diferentes parâmetros para cada técnica.
4. Selecionar os transformantes, extrair DNA genômico e confirmar a inserção do DNA exógeno por PCR.
5. Avaliar a estabilidade mitótica dos transformantes obtidos.
6. Avaliar o número de cópias integradas por Southern blot.
7. Construir uma linhagem repórter de *F. pedrosoi* contendo o gene *gfp*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Linhagens, cultivo e manutenção de *F. pedrosoi*

Neste trabalho foi utilizada a estirpe CBS 271.37 de *F. pedrosoi* (ATCC18658) que foi congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em glicerol 50% e a cada experimento repicada em ágar Sabouraud dextrose (para 1L: 10 g de peptona, 40 g de glicose, 15 g de agar pH: 5,6 autoclavado a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ ), incubada a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante sete dias. Para obter os conídios, *F. pedrosoi* foi cultivado em Caldo batata (Para 1L: caldo de 100 g de batata picada sem casca cozida, 10 g de glicose, 1 mL de Clorafenicol  $25\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , pH: 5,6, autoclavado a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ ) durante sete dias a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob agitação de 200 rpm. A cultura foi agitada vigorosamente por 1 minuto por vortex para liberar os conídios que foram filtrados através de lã de vidro esterilizada, centrifugados a  $3.000 \times g$  durante cinco minutos, ressuspensos em solução salina (NaCl 0,9 %) e contados em câmara de Neubauer para ajustar a densidade. As culturas de *Escherichia coli* foram mantidas congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e repicadas em meio L (para 1L: 10 g peptona; 5 g extrato de levedura; 10 g cloreto de sódio; 15 g de agar; pH: 7.2) para preparação de células termo competentes segundo protocolo de Inoue *et al.*, 1990.

### 4.2. Testes de susceptibilidade aos antibióticos usados como marcadores dominantes seletivos

Os conídios de *F. pedrosoi* foram plaqueados nas quantidades de  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  em placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de Higromicina B (Invitrogen), Nourseotricina (Jena Bioscience) e Neomicina ou G418 (Invitrogen) nas concentrações de 25, 50 e  $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ , e também na ausência das drogas. A sensibilidade ao antibiótico foi estimada com base no crescimento micelial após incubação por até 30 dias a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3. Construção do cassete de Resistência a Higromicina B

O cassete contendo o gene que confere resistência à Higromicina B, foi construído por PCR de sobreposição. A região de 1,1 kb do promotor do gene *gadh* de *F. pedrosoi* foi amplificada a partir de DNA genômico de CBS271.37, o *hph* (higromicina fosfotransferase) foi amplificado a partir de pAN7.1 (Punt *et al.*, 1987) (Figura 3) e a região de 0,34 kb referente ao terminador *trpC* de *F. pedrosoi* também foi amplificada a partir do DNA genômico de CBS271.37. Para amplificação dos

fragmentos foi utilizada a enzima One taq DNA polymerase Master Mix (NEB), 20 ng de DNA molde (DNA genômico de *F. pedrosoi* CBS 271.37 – para amplificação do fragmento de 1,1 kb da região de promotora de *gapdh* e 0,34 kb da região terminadora de *trpC* e pAN7.1, contendo o gene de resistência *hph*) e 0,2 $\mu$ M de cada oligonucleotídeo. O ciclo de amplificação consistiu basicamente de:

Ciclo:	94 °C	30 segundos	} 35 X
	94 °C	30 segundos	
	58 °C	30 segundos	
	68 °C	2 minutos	
	68 °C	5 minutos	

---

Para construção do cassete final, os três fragmentos foram fusionados por PCR de sobreposição. Para reação de recombinação do fragmento *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* (2,46 kb) com o plasmídeo pBluescript KS+ (Figura 4) linearizado com *BamHI* e *EcoRV* foi utilizado o Kit Infusion (Clontech), 100 ng de cada fragmento nas seguintes condições: 37 °C - 15 minutos e 50 °C -15 minutos. Foi utilizado um volume de 2  $\mu$ L da reação de fusão para transformação de 50  $\mu$ L *E. coli* termo competentes e a seleção foi feita em meio L contendo 100  $\mu$ g/ mL de Ampicilina. A extração de DNA plasmidial foi realizada por miniprep caseira.

Os plasmídeos extraídos foram submetidos a digestão com as enzimas *EcoRV* e *BamHI* (NEB) para a liberação do inserto. Para a digestão foram utilizados 2  $\mu$ g de DNA plasmidial e 2,5 U de cada enzima, incubados a 37 °C durante à noite. Os plasmídeos que continham o cassete inserido foram então designados **pFpHYG** e usados para a transformação por biobalística de conídios de *F.pedrosoi*.

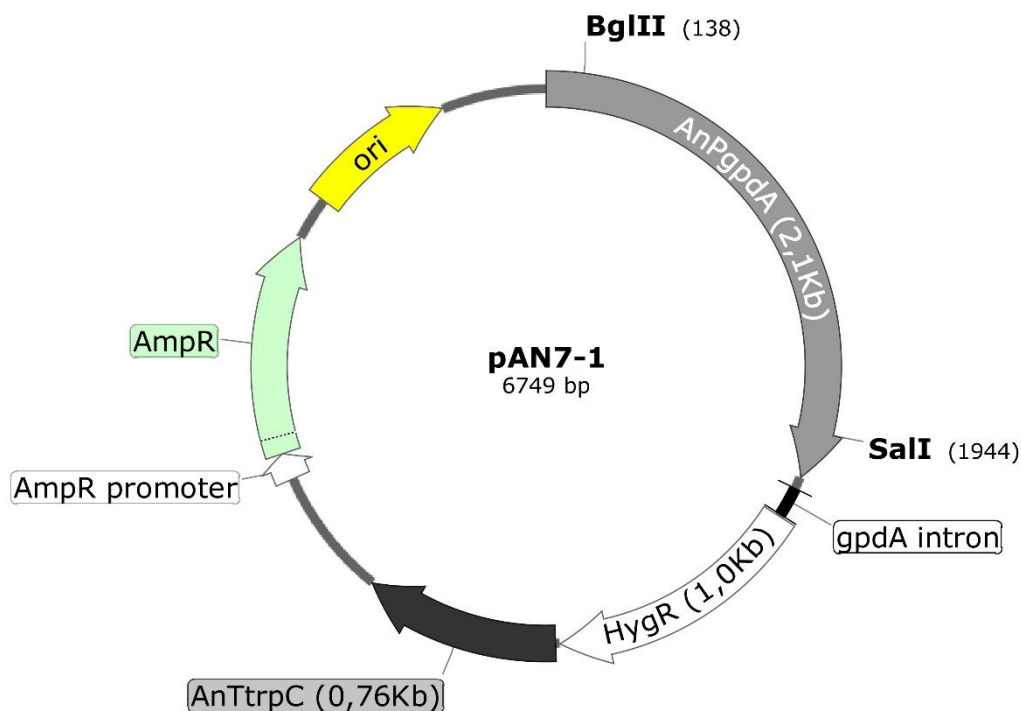


Figura 3: Representação esquemática do plasmídeo pAN7.1 utilizado como molde para amplificação do gene de resistência a Higromicina B, nos experimentos de biobalística e como controle positivo no Southern Blot. Este plasmídeo apresenta o gene *hph* controlado pelo promotor de Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Aspergillus nidulans* (*AnPgpdA*) e pelo terminador de *trpC* de *A.nidulans* (*AnTrpC*) Referência Punt *et al.*, 1987.

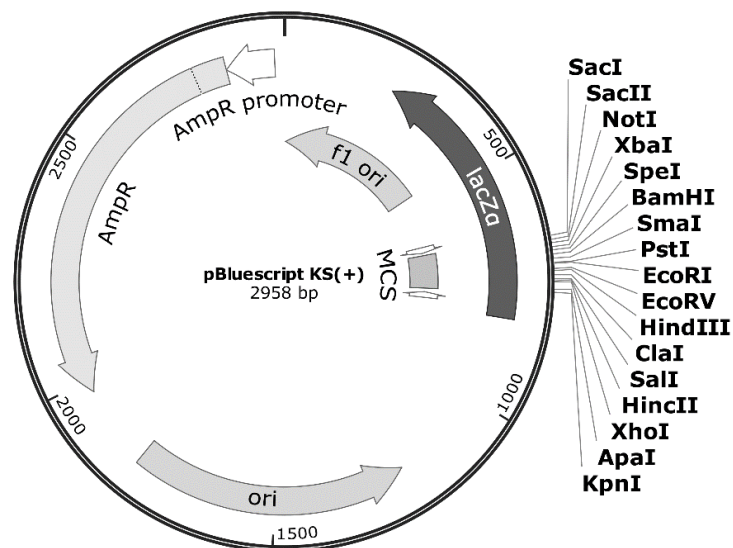


Figura 4: Representação esquemática do plasmídeo pBluescript KS + utilizado para recombinação do cassette de resistência a Higromicina B construído neste trabalho, nos sítios de *BamHI* e *EcoRV*.

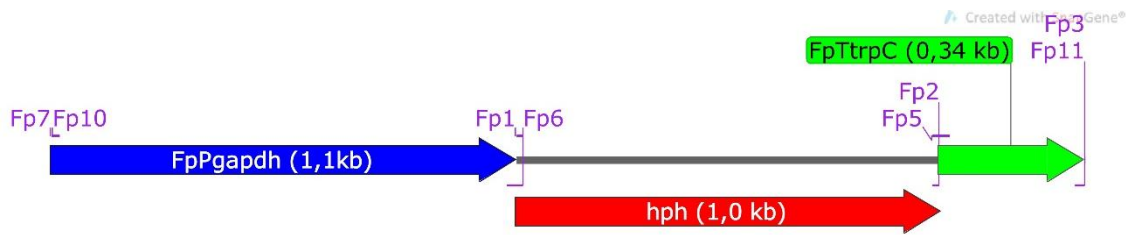


Figura 5: Representação esquemática da construção do cassete de resistência a Higromicina B. Foi feita PCR para amplificar os fragmentos *FpPgadh* 1,1kb (Fp7/Fp6), *hph* 1kb (Fp 1/Fp 2) e *ttrpC*\_Fp 0,34kb (Fp 5/Fp3), em seguida a PCR de sobreposição para montar o cassete de resistência à Higromicina B 2,4kb (Fp 10/ Fp 11), que foi clonado por recombinação no plasmídeo pBluescript II KS + nos sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RV.

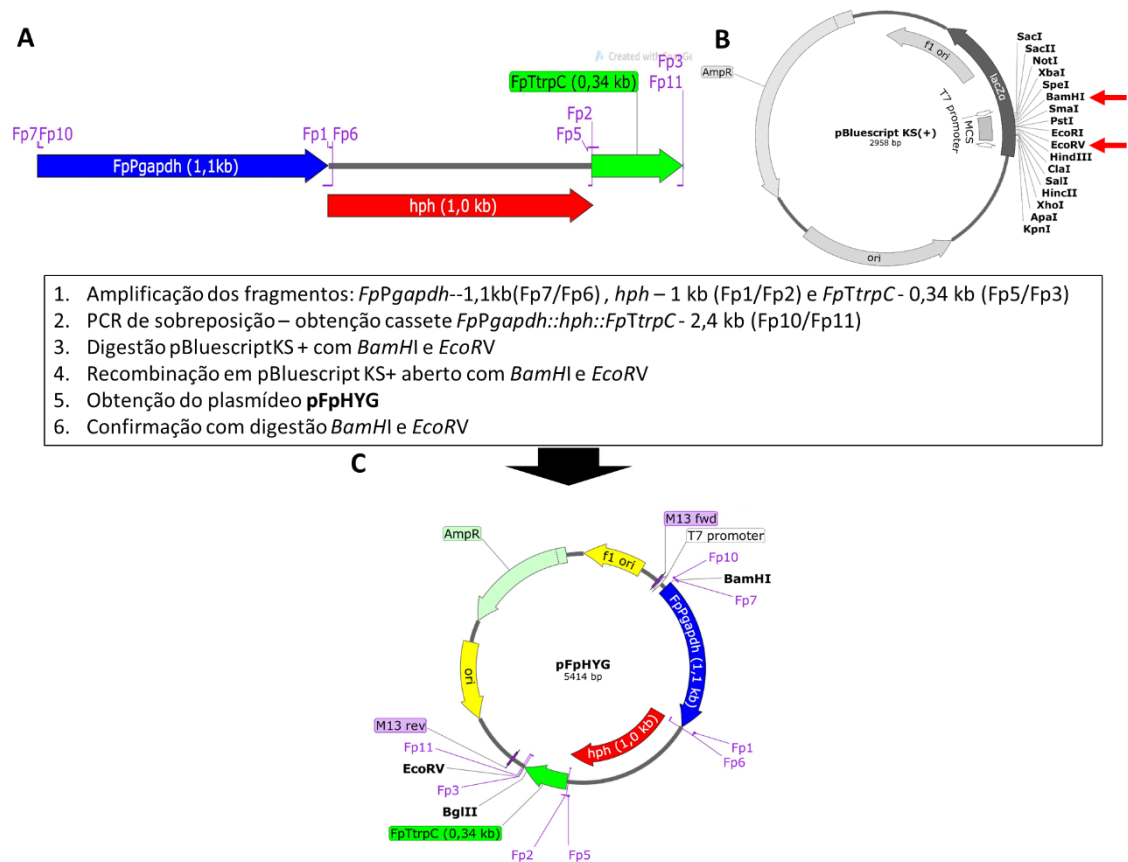


Figura 6: Representação esquemática da construção do plasmídeo pFpHYG obtido neste trabalho, contendo o cassete de resistência a Higromicina B. (A) Cassete de resistência a Higromicina B. (B) Mapa do plasmídeo pBluescript KS + utilizado para recombinação do cassete de resistência a Higromicina B construído neste trabalho e (C) Mapa do plasmídeo pFpHYG.

#### 4.4. Construção plasmídeo para transformação via *Agrobacterium* contendo cassete de resistência a Higromicina B

O cassete de resistência a Higromicina B (*FpPgadh*::*hph*::*FpTrpC* – 2,46 kb) construído para uso na técnica de biobalística foi clonado em plasmídeo que contém

sequências necessárias de *Agrobacterium* para transferência do T-DNA, e nomeado pZPFpHPH (Figura 7). Para isso o plasmídeo pZPNAT (Walton *et al.*, 2005) que contém gene de resistência a Nourseotricina (*nat*) controlado por sequências específicas de *Cryptococcus neoformans*, um basidiomiceto, foi digerido primeiramente com *EcoRI* (10 µg de plasmídeo e 20 U de *EcoRI* incubados a 37 °C durante à noite) para liberar o cassete de 1,6 kb que confere resistência à Nat. O vetor foi então re-circularizado usando a enzima Ligase (NEB) e denominado de pZPERI e em seguida foi digerido com *BamHI* e *SalI* (NEB) incubados a 37 °C durante à noite. O plasmídeo pFpHYG também foi digerido com as mesmas enzimas e condições para liberação do cassete *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* - 2,46 kb. A ligação de pZPERI com o cassete de resistência a Higromicina B foi realizada com ligase (NEB), 3 µL da reação foram utilizados para transformação em células termo-competentes de *E. coli* e a seleção foi feita em meio L contendo 50 µg/ mL de canamicina. A extração de DNA plasmidial foi realizada por miniprep (protocolo descrito anteriormente) e os plasmídeos extraídos foram submetidos a digestão com as enzimas *BamHI* e *SalI* (NEB) para a liberação do inserto. Os clones confirmados foram estocados a -80 °C e um foi escolhido para transformação em células competentes de *Agrobacterium* (linhagem EHA105) preparadas segundo Holsters,1978. As colônias de *Agrobacterium* que cresceram em 50 µg/ mL de Canamicina, foram selecionadas para extração de DNA plasmidial e foi realizada PCR das amostras com a enzima One Taq Master Mix com os oligonucleotídeos Fp 7 e Fp 3, que amplificam o cassete de resistência a Higromicina B, com tamanho esperado de aproximadamente 2,4 kb. O ciclo de amplificação consistiu basicamente de:

Ciclo:	94 °C	30 segundos	} 35 X
	94 °C	30 segundos	
	54 °C	30 segundos	
	68 °C	2:30 minutos	
	68 °C	5 minutos	

---

As colônias positivas de *Agrobacterium* foram armazenadas a -80 °C e uma foi escolhida para transformação dos conídios de *F. pedrosoi*. O plasmídeo pAD1625 (Abuodeh *et al.*, 2000) também foi utilizado para a transformação mediada por *Agrobacterium* e contém marcador seletivo de resistência a hygB controlado por

Promotor *cpc-1* (*cross-pathway control gene*) de *Neurospora crassa* e terminador *trpC* de *A. nidulans*.



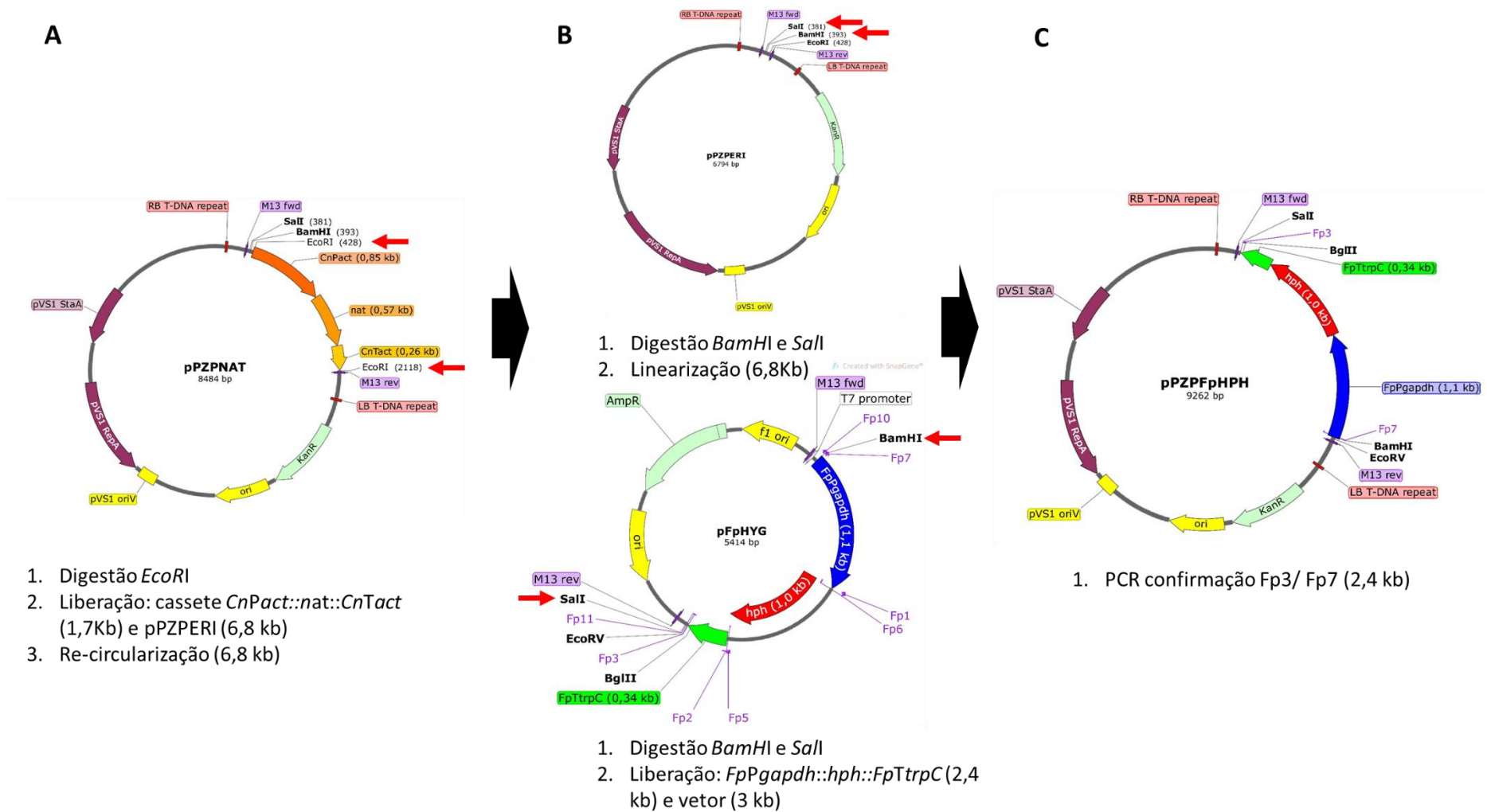


Figura 7: Etapas da construção do plasmídeo pPZPFpHPH obtido neste trabalho para transformação genética via *Agrobacterium*, contendo o cassete de resistência a Higromicina B. (A) Mapa do plasmídeo pPZPNAT, as setas em vermelho indicam os sítios de restrição utilizados para a liberação do cassete de NAT. (B) Mapa do plasmídeo pPZPERI (C) Mapa do plasmídeo construído pPZPFpHPH.

#### 4.5. Construção cassete de resistência à Neomicina

O cassete contendo o gene de resistência à Neomicina ou G418 como marcador seletivo foi construído por PCR de sobreposição. A região do promotor de *trpC* de *A. nidulans* (0,37 kb) foi amplificada do plasmídeo pSILENT-1 (Nakayashiki *et al.*, 2005) usando os oligonucleotídeos Fp 86 e Fp 87, o terminador de actina de *F. pedrosoi* (0,43kb) foi amplificado a partir do DNA genômico da cepa CBS271.37 usando os oligonucleotídeos Fp 81 e Fp 85 e o fragmento que contém a ORF relativa ao gene aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (*neo*) de 0,93 kb foi amplificado a partir de pPZPNEO (Walton *et al.*, 2005) com Fp 82 e Fp 83. Para amplificação dos fragmentos referentes ao promotor *AnPtrpC* e terminador *FpTact* foi utilizada a enzima One taq DNA polymerase Master Mix (NEB), e para a amplificação de *neo* foi utilizada a enzima Long AMP Master Mix (NEB), 50 ng de DNA alvo e 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo. O ciclo de amplificação consistiu basicamente de:

Ciclo:	94 °C	30 segundos	} 35 X
	94 °C	30 segundos	
	57 °C	30 segundos	
	68 °C	1:40 minutos	
	68 °C	5 minutos	

---

Para construção do cassete final, os três fragmentos foram fusionados por PCR de sobreposição utilizando os oligonucleotídeos Fp 81 e Fp 86, que contém nas extremidades sítios de *KpnI* e *SalI*, respectivamente. Para clonagem do fragmento *AnPtrpC::neo::FpTact* (1,73 kb) no plasmídeo pGEMT Easy, foi feita uma ligação com a enzima T4 Ligase (Promega) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado um volume de 3  $\mu$ L da reação de ligação para transformação em *E.coli* termo competentes (50  $\mu$ L) e a seleção foi feita em meio L contendo 100  $\mu$ g/ mL de Ampicilina. A extração de DNA plasmidial foi realizada por miniprep e os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão com a enzima *NotI*, da marca NEB para a liberação do inserto. Os plasmídeos que continham o cassete construído foram então designados pFpNEO e usados para a transformação por biobalística de conídios de *F. pedrosoi*.



Figura 8: Representação esquemática da construção do cassete de resistência à Neomicina. Foi feita PCR para amplificar os fragmentos *AnPtrpC* (0,37 kb, Fp 86/Fp 87), que contém *neo* (0,93 kb, Fp 82/Fp 83) e *FpTact* (0,42 kb, Fp 85/Fp 81). Em seguida a PCR de sobreposição com Fp 86 e Fp 81 foi realizada para obtenção do cassete de resistência *AnPtrpC::neo::FpTact* (1,73kb), que foi clonado por ligação no plasmídeo pGEMT-Easy. Tamanho da ORF de *neo* é de 0,79kb.

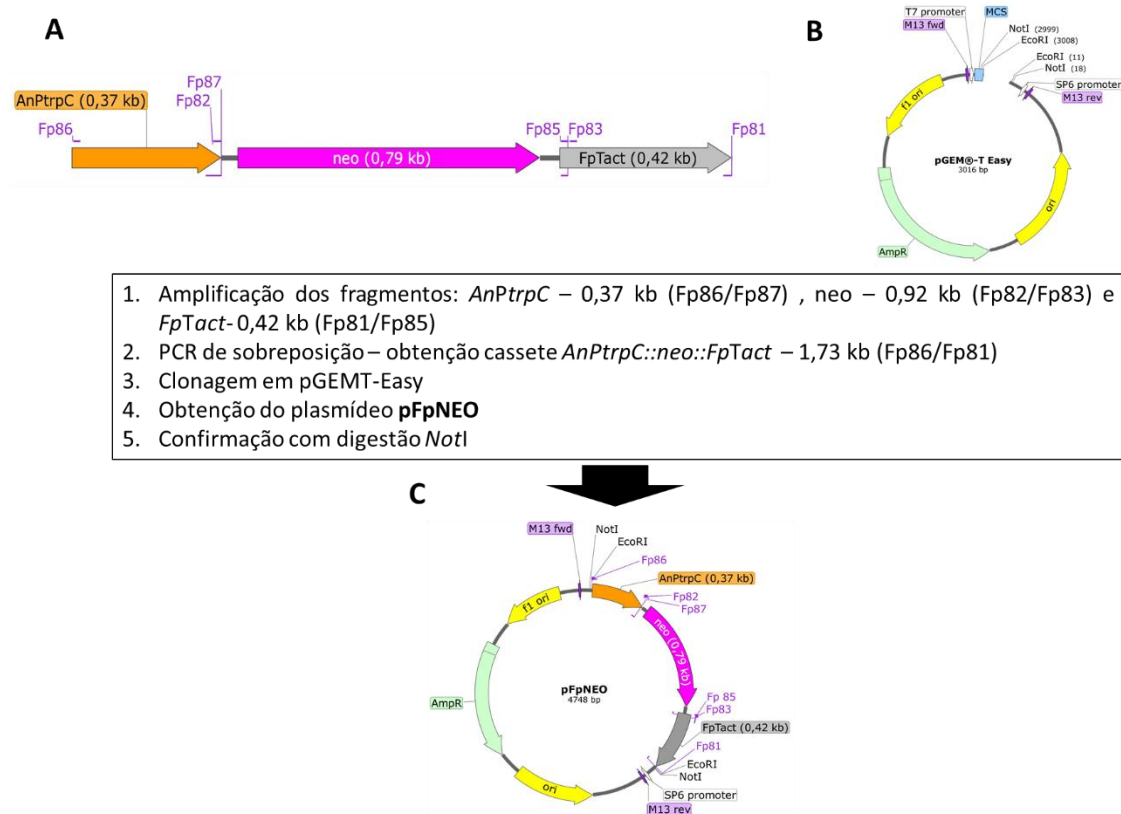


Figura 9: Etapas da construção do plasmídeo pFpNEO obtido neste trabalho, contendo o cassete de resistência a Neomicina. (A) Cassete de resistência à Neomicina. (B) Mapa do plasmídeo pGEM-T Easy utilizado para recombinação do cassete de resistência à Neomicina construído neste trabalho e (C) Mapa do plasmídeo pFpNEO.

#### 4.6. Construção cassete de resistência à Nourseotricina

O cassete contendo o gene de resistência à Nourseotricina (*nat*: nourseotricina acetiltransferase) como marcador seletivo, foi construído por PCR de sobreposição, exatamente como descrito para a construção do cassete de resistência à Neomicina, exceto que o DNA molde para amplificação de *nat* foi o plasmídeo pPZPNAT (Walton *et al.*, 2005), que apresenta o gene de resistência controlado por sequências específicas

de *C. neoformans*. Os oligonucleotídeos Fp 82 e Fp 83 foram usados para amplificação de *nat*, uma vez que as sequências franqueadoras dos marcadores seletivos *neo* e *nat*, nos plasmídeos originais pPZPNEO e pPZPNAT, respectivamente eram as mesmas, no entanto o fragmento obtido para *nat* foi de 0,72 kb, sendo a ORF de 0,57 kb. Para construção do cassete final, os três fragmentos *AnPtrpC* (0,37 kb), *nat* (0,72 kb) e *FpTact\_Fp* (0,42 kb) foram fusionados por PCR de sobreposição com a enzima LongAmp Master Mix (NEB), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo Fp 86 e Fp 81 e o ciclo de amplificação consistiu basicamente de:

Ciclo:	94 °C	1 minuto	} 35 X
	94 °C	30 segundos	
	58 °C	1 minuto	
	65 °C	3 minutos	
	65 °C	10 minutos	

Para clonagem do fragmento *AnPtrpC::nat::FpTact* (1,52 kb) no plasmídeo pGEMT Easy, foi feita uma ligação com a enzima T4 Ligase (Promega) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado um volume de 3 µL da reação de ligação para transformação em *E.coli* termo competentes (50 µL) e a seleção foi feita em meio L contendo 100 µg/ mL de Ampicilina. A extração de DNA plasmidial foi realizada por miniprep e os plasmídeos extraídos foram submetidos a digestão com a enzima *EcoRI*, da marca NEB para a liberação do inserto. Os plasmídeos que continham o cassete construído foram então designados pFpNAT e usados para a transformação por biobalística de conídios de *F. pedrosoi*.

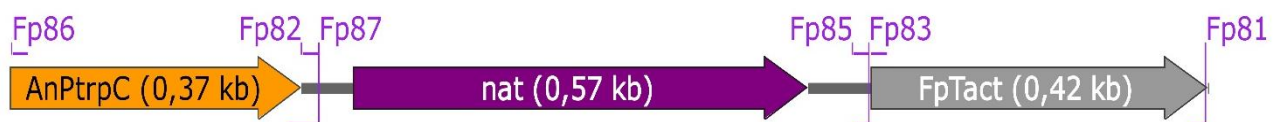


Figura 10: Representação esquemática da construção do cassete de resistência à Nourseotricina. Foi feita PCR para amplificar os fragmentos *AnPtrpC* (0,37 kb, Fp 86/Fp 87), que contém *nat* (0,72 kb, Fp 82/Fp 83) e *FpTact* (0,42 kb, Fp 85/Fp 81). Em seguida a PCR de sobreposição com Fp 86 e Fp 81 foi realizada para obtenção do cassete de resistência *AnPtrpC::nat::FpTact* (1,51 kb), que foi clonado no plasmídeo pGEMT-Easy. Tamanho da ORF de *nat* é de 0,57 kb.

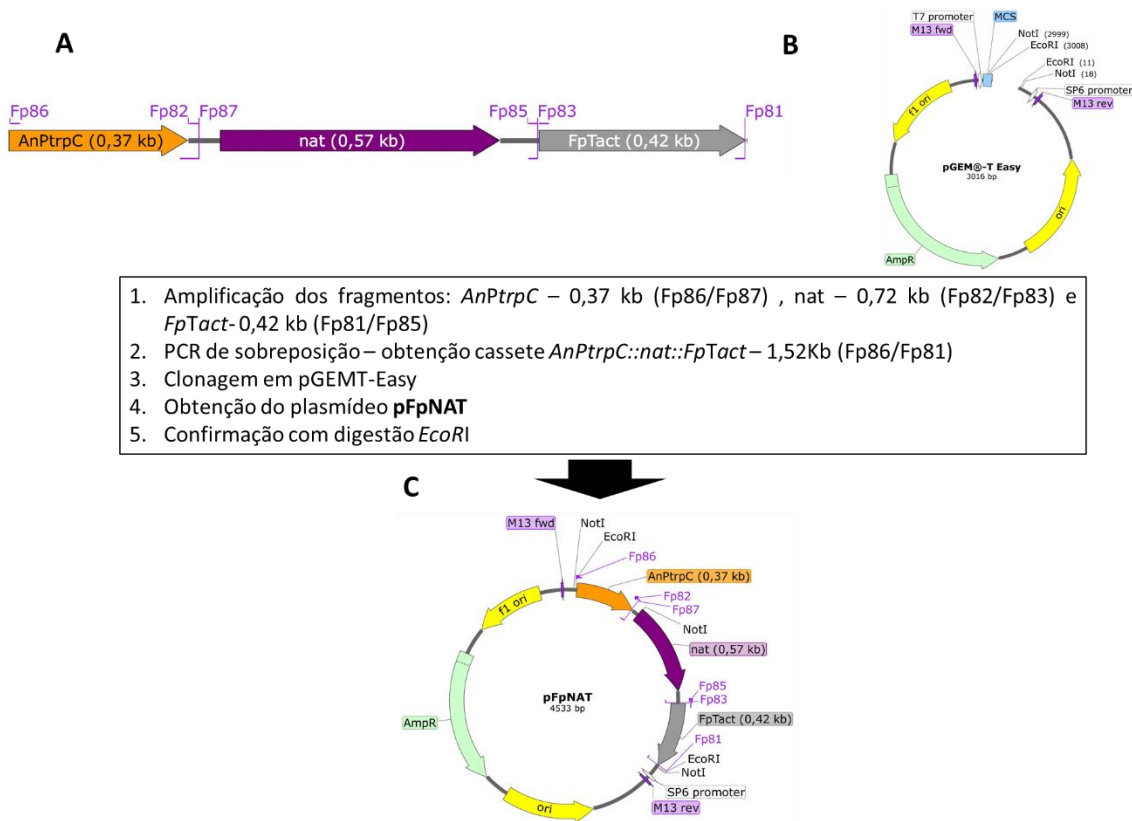


Figura 11: Etapas da construção do plasmídeo pFpNAT obtido neste trabalho. (A) Cassete de resistência a Nourseotricina. (B) Mapa do plasmídeo pGEM-T Easy utilizado para recombinação do cassete de resistência à Nourseotricina construído neste trabalho e (C) Mapa do plasmídeo pFpNAT.

#### 4.7. Extração DNA plasmidial

Para a extração de plasmídeo foram escolhidas colônias isoladas de *E. coli*, e estas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com Ampicilina (100 µg/mL) ou outro antibiótico adequado e submetidas a crescimento a 37 °C sob agitação de 250 rpm, durante à noite. Um mililitro das células foi guardado a 4 °C para estoque em glicerol no -80 °C e o restante foi centrifugado a velocidade máxima por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 200 µL da solução I (EDTA 1 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 8), logo após, foram adicionados 360 µL da solução II (NaOH 200 mM e SDS 1%), a solução foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foram adicionados 300 µL da solução III gelada (acetato de potássio 60% e ácido acético glacial 11.5%), as amostras foram homogeneizadas novamente e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a velocidade máxima por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Em seguida foram adicionados 750 µL de isopropanol às

amostras, estas foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, logo após as amostras foram centrifugadas a velocidade máxima por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL da solução I, sendo adicionado 110 µL de acetato de amônio 7,5M. As amostras foram agitadas vigorosamente e após isso foram centrifugadas a velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e acrescentou-se 750 µL de etanol 100 %. Centrifugou-se novamente as amostras a velocidade máxima por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70 %. Centrifugaram-se novamente as amostras à velocidade máxima por 5 minutos, descartando o sobrenadante e retirando o excesso de álcool com a pipeta. As amostras foram secadas a temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida foram adicionados 50 µL de água milliQ contendo RNase A na concentração final de 100 µg/mL. As amostras foram incubadas a 37 °C por no mínimo 1 h. Por fim, foram aplicados 2 µL das amostras em gel de agarose 1% para checar a eficiência da purificação.

#### **4.8. Transformação Biobalística**

##### **4.8.1. Inóculo de *F. pedrosoi***

Os conídios de *F. pedrosoi* foram obtidos como descrito anteriormente, foram contados em câmara de Neubauer e a densidade ajustada.  $1,3 \times 10^9$  conídios foram semeados na superfície de membrana de celofane estéril alocada em placa de Petri contendo Sabouraud 35gar. As placas foram submetidas a secagem no fluxo laminar pelo período de 1-2 h .

##### **4.8.2. Esterilização das partículas de tungstênio**

Neste trabalho utilizou-se partículas de tungstênio M10 diâmetro médio de 0,7 µm (intervalo 0,4- 1,5 µm) (Biorad) para carreamento do DNA a ser transformado. Para esterilização das partículas, pesou-se 30 mg (0,03 g) em microtubo e adicionou-se 1 mL de etanol 70%. Vortexou-se 20 minutos na velocidade mínima, em seguida, centrifugou-se na velocidade máxima por 10 min e o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta. Foram feitas três lavagens com 1 mL de água milliQ estéril, centrifugou-se a velocidade máxima por 10 min, o sobrenadante foi descartado e as partículas ressuspensas em 500 µL de glicerol 50 % estéril.

##### **4.8.3. Precipitação do DNA nas partículas de tungstênio**

As partículas estéreis foram incubadas em banho sonicador para desgrumar por sete minutos, após foram agitadas a velocidade máxima por 2 minutos. Foi pipetado em um microtubo na seguinte ordem: 50 µL partículas estéreis, 5 µL DNA (contendo 1 µg de DNA para cada placa a ser transformada), 50 µL CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) estéril, 20 µL espermidina (0,1 M) estéril. A mistura foi agitada com uso de vortex na velocidade mínima por 10 minutos, foi precipitada por centrifugação por 10 segundos em velocidade máxima. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 150 µL de etanol absoluto para lavagem das partículas. Foram realizadas 3 lavagens e no final da última foram adicionados 4 µL de etanol absoluto para cada placa a ser bombardeada. A amostra rapidamente foi submetida a sonicação e as partículas foram distribuídas nas membranas macrocarreadoras estéreis (Biorad) encaixadas nos discos metálicos. As amostras foram incubadas em sílica para secagem por pelo menos 30 minutos antes do bombardeamento. Para a transformação biobalística de *F. pedrosoi*, todos os plasmídeos foram transformados na forma circular.

#### **4.8.4. Procedimento para bombardeamento das placas e seleção dos transformantes**

O aparelho utilizado para o bombardeamento foi o PDS-1000/He system (Biorad) foi esterelizado previamente por UV. O bombardeamento seguiu as instruções do fabricante, sendo o vácuo de 26 mmHg, a pressão de Hélio de 1.350 psi e as distâncias de 6 ou 9 cm entre as partículas e as células alvo foram avaliadas. Após o bombardeamento as placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas em estufa 25 °C por 24 ou 48 h para recuperação das células. Após o período de incubação, a membrana de celofane foi lavada com solução salina para remover os conídios, que foram semeados em placas contendo Sabouraud acrescido de 50 µg/mL de Higromicina B, Nourseotricina ou Neomicina a depender da marca de seleção do plasmídeo e depois incubadas a 25 °C, até o aparecimento de colônias. Após o crescimento das colônias em meios seletivos, os mutantes foram testados quanto à estabilidade mitótica, após três passagens consecutivas em meios não seletivos. A presença dos genes *hph*, *nat* ou *neo* nos transformantes foi confirmada por PCR. Pelo menos três experimentos independentes foram feitos, em duplicata para avaliar os parâmetros, distância das partículas às células alvo (6 ou 9 cm) e tempo de recuperação das células após bombardeamento (24 ou 48 h).

#### 4.9. Transformação mediada por *Agrobacterium*

Para transformação mediada por *Agrobacterium* da cepa CBS 271.37 de *F. pedrosoi* o protocolo foi modificado a partir de Michielse *et al.*, (2008). Os conídios foram purificados e a densidade ajustada exatamente como descrito anteriormente. Os plasmídeos pPZPFpHPH (construído neste trabalho) e pAD1625 (Abuodeh *et al.*, 2000), que contêm *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* e *NcPcpc-1::hph::AnTtrpC*, respectivamente foram inseridos na cepa de *Agrobacterium* EHA105. As cepas de *Agrobacterium* contendo os plasmídeos foram armazenadas à -80 °C, e previamente antes do uso foram inoculadas em meio L contendo antibióticos (pAD1625 – 100 µg/mL Ampicilina e pPZPFpHPH – 40 µg/mL Canamicina), incubadas a 28 °C por 48 h. Duas grandes colônias de *Agrobacterium* foram inoculadas em 10 mL de meio L líquido contendo antibióticos e incubadas a 28 °C, sob agitação de 250 rpm durante à noite. As células foram centrifugadas no dia seguinte a 2.400 ×g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 5 mL de solução salina, centrifugou-se novamente por 5 minutos a 2.400 ×g, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de Indução (IM) (para 1L: Sais a 2.5X (400 mL) (28 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6,5 mM NaCl; 5,1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,15 mM CaCl<sub>2</sub>; 22 µM FeSO<sub>4</sub>; 9,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); 1,8 g de glicose; 5 mL de glicerol) contendo 0,2 mM Acetoseríngona (AS) e 40 mM MES (2-(N-morfolino) ácido etanosulfônico. A densidade celular foi ajustada para OD<sub>600nm</sub> entre 0,2 e 0,3 e incubado a 28 °C a 100 rpm de 4 a 8 horas até OD<sub>600nm</sub> atingir 0,6 a 0,8. As proporções de *Agrobacterium*: conídios foram ajustadas para 1: 1, 10: 1 e 100: 1, sendo número de conídios de 1,0 × 10<sup>8</sup> ou 1,0 × 10<sup>6</sup> e em seguida plaqueadas diretamente na superfície de IM Agar (para 1L: Sais a 2,5 X (28 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6,5 mM NaCl ; 5,1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,15 mM CaCl<sub>2</sub>; 22 µM FeSO<sub>4</sub>; 9,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); 0,9 g de glicose; 5 mL de glicerol; 20 g de agar) contendo 0,2 mM AS e 40 mM MES e as placas foram incubadas a 25 °C durante 48 ou 72 h (tempo de co-cultivo). Após o co-cultivo as células foram recolhidas e semeadas em ágar Sabouraud contendo cefotaxima (200 µM) e Higromicina B (50 µg/mL) e incubadas a 25 °C, até o aparecimento de colônias. Após o aparecimento de colônias, foram selecionados os transformantes para testes de estabilidade mitótica, extração de DNA genômico e também foi realizada PCR para confirmar a integração do marcador seletivo no genoma dos mutantes. Pelo menos três experimentos independentes foram feitos.



#### 4.10. Teste de estabilidade mitótica

Mutantes de *F. pedrosoi* obtidos das transformações mediadas por biobalística e *Agrobacterium* foram escolhidos aleatoriamente para serem repicados três vezes no meio seletivo e não seletivo para checar a estabilidade mitótica.

#### 4.11. Extração de DNA genômico de *F. pedrosoi*

Para confirmar os mutantes obtidos, foi necessário estabelecer um protocolo para extrair DNA genômico de *Fonsecaea*. As células foram cultivadas em Sabouraud líquido por sete dias sob agitação de 200 rpm a 28 °C e após esse período foram coletadas por centrifugação em velocidade máxima por cinco minutos, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 0,5 mL de tampão TENTS (2% Triton, 10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl e 1% SDS) e pérolas de vidro (0,6 µm), os tubos foram congelados em Nitrogênio líquido por um minuto e foi levado ao TissueLyser (QIAGEN) duas vezes por dois minutos a 33Hz. Foi acrescentado 0,5 mL de fenol: clorofórmio e submetido a agitação vigorosa por 5 segundos a velocidade máxima. Centrifugou-se por 5 minutos a velocidade máxima e a fase aquosa foi transferida para novo microtubo. Adicionou-se 50 µL de NaOAc 5 M e 1 mL de etanol absoluto, e agitou-se novamente e centrifugou-se por quinze minutos a velocidade máxima. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de etanol 70% para lavagem do precipitado. Centrifugou-se novamente a amostra em velocidade máxima por 5 minutos. O excesso de álcool foi retirado com a pipeta e os microtubos foram secados a temperatura ambiente por cinco minutos. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água MilliQ contendo 100 µg/mL de RNase A, e incubado a 37°C por pelo menos 1 h.

#### 4.12. PCR de confirmação dos mutantes de *F. pedrosoi*

Após extração de DNA genômico de colônias escolhidas aleatoriamente das placas de avaliação da estabilidade mitótica, foi feita a confirmação da presença do gene que confere resistência aos antibióticos nos transformantes usando oligonucleotídeos específicos para amplificação de *hph* (Fp 1 e Fp 2 – tamanho esperado 1 kb), *nat* (Fp 82 e Fp 83 – tamanho esperado 0,72 kb) e *neo* (Fp 82 e Fp 83 – tamanho esperado 0,93 kb). Para as PCRs de confirmação foram utilizados 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e a enzima OneTaq Master Mix (NEB); o ciclo de amplificação seguiu as recomendações do fabricante.

#### 4.13. Confirmação do número de integrações por Southern Blot

Além da técnica de PCR para confirmação da presença do gene de resistência no genoma dos transformantes, foi realizado também Southern blot para as colônias resistentes a Higromicina B obtidas por *Agrobacterium* e biobalística, para demonstrar que houve a inserção do cassete de resistência e estimar o número de cópias integradas ao genoma. Inicialmente foi realizado um estudo de restrição e observou-se que *Bg/III* não apresentava sítio de restrição no gene de resistência *hph*, no entanto apresenta um único sítio dentro dos plasmídeos pAN7.1, pFpHYG e no T-DNA dos plasmídeos pAD1625 e pZPFpHPH. A sonda escolhida foi amplificada e marcada com Digoxigenina, segundo instruções do fabricante do Kit PCR DIG PROBE SYNTHESIS KIT (ROCHE) e corresponde a 0,62 kb da ORF de *hph* (oligonucleotídeos LF 08 e LF 29). 10 µg de DNA genômico foi digerido com 30 U de *Bg/III* (NEB), a 37 °C durante a noite. Após a digestão do gDNA, foi realizada a eletroforese, e posteriormente o tratamento do gel para montar o sistema de transferência. O tratamento do gel foi realizado utilizando primeiramente a solução depurinadora (0,25 M de HCl fumegante), uma vez por quinze minutos; depois foi utilizada a solução desnaturadora (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) por trinta minutos, em seguida foi utilizada a solução neutralizadora (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris base), por trinta minutos. Depois do tratamento do gel procedeu-se com a transferência do DNA digerido para a membrana de Nylon (Hybond N+, GE), que se deu por capilaridade usando SSC 20 × (Para 1 litro: 175,3 g NaCl; 88,2 g citrato de sódio). No dia seguinte foi realizado o “crosslinking” com UV para fixação do DNA à membrana, e em seguida a hibridização ocorreu a 50 °C durante a noite, segundo instruções do fabricante do Kit (DIG EASY HYB™ GRANULES, ROCHE). Após hibridização, a membrana foi lavada segundo instruções do fabricante do kit DIG WASH AND BLOCK BUFFER SET (CAT, ROCHE), e a detecção foi feita usando Anticorpo Fab Anti-digoxigenina conjugado a Fosfatase alcalina (ROCHE) e CDP-STAR (CDP-STAR® DETECTION REAGENT, ROCHE) e a revelação da membrana foi realizada pelo equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE). Foram usados como controles o DNA genômico de CBS 271.37 não transformado, os plasmídeos pAN7.1, pFpHYG e pZPFpHPH, que apresentam a marca *hygR*, linearizados com *Bg/III*.

#### 4.14. Obtenção dos mutantes que expressam GFP de *F. pedrosoi*

Para gerar os mutantes produtores de GFP (Green fluorescent protein) o plasmídeo gGFP (Maor *et al.*, 1998) foi inserido por biobalística em *F. pedrosoi* utilizando o mesmo protocolo descrito e a seleção dos transformantes foi feita com Higromicina B (50 µg/ mL). As colônias que cresceram no meio seletivo foram visualizadas e fotografadas por microscopia de fluorescência para detecção da expressão do GFP utilizando o microscópio Axiovert 100, Carl Zeiss com o filtro 38 HE (verde). Após a extração de DNA genômico das colônias positivas, foi realizado PCR com os oligonucleotídeos Fp 1 e Fp 2 para amplificação do gene *hph*.

#### 4.15. Oligonucleotídeos usados neste trabalho

**Tabela 4: Tabela de Oligonucleotídeos**

Nome	Sequência (5'>3')	Alvo
Fp 1	ATGCCTGAACTCACCGCGAC	<i>hph</i>
Fp 2	CTATTCTTTGCCCTCGGACGA	<i>hph</i>
Fp 3	AACGAGGCCAAAGAGGATGGATG	<i>TrpC</i>
Fp 5	TCGTCCGAGGGCAAAGAATAGATACCAGACCAGACACCTTG	<i>FpPgapdh</i>
Fp 6	GTCGCGGTGAGTTCAGGCATGGTCTCGTCAAGATGTGAAGA	<i>FpPgapdh</i>
Fp 7	GTCGTATCAGTCTTGAGTCGGATA	<i>FpPgapdh</i>
Fp 10	AGAACTAGTGGATCCGTCGTATTGAGTCTTGAGTCGGATA	<i>FpPgapdh::hph:: FpTrpC</i>
Fp 11	GATAAGCTTGATATCAACGAGGCCAAAGAGGATGATG	<i>FpPgapdh::hph:: FpTrpC</i>
Fp 81	CAAAAGCTGGGTACCTCCACTGGATGACTACTGGTCC	<i>FpTact</i>
Fp 82	CGTCTCCTAATATGCAGCCTCT	<i>neo/nat</i>
Fp 83	GCCCAGATTGCATCACTTCT	<i>neo/nat</i>
Fp 85	AGAAGTGATGCAATCTGGGCACACTCTTTGAGCATCGGGTA	<i>FpTact</i>
Fp 86	GCCTCTGCAGGTCGACCGCGACGTTAACTGATATTG	<i>AnPgapdh</i>
Fp 87	AGAGGCTGCCATATTAGGAGACGCGATGCTTGGGTAGAATAGG	<i>AnPgapdh</i>
LF 08	GATGTTGGCGACCTCGTATT	5' <i>hph</i> sonda
LF 29	AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT	3' <i>hph</i> sonda

#### 4.16. Análises estatísticas

Os dados obtidos referentes aos parâmetros e condições testadas nos experimentos de transformação genética foram analisados empregando-se o programa GraphPad Prism versão 6.01 para Windows (GraphPad Programa). A normalidade da distribuição dos dados foi verificada por meio do teste Shapiro-Wilk. O teste

paramétrico Two-Way ANOVA com pós-teste de Tukey foi empregado para comparar as variações entre os grupos com mais de uma variável. O teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey foi empregado para comparar as variações entre os grupos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Susceptibilidade aos antibióticos usados como marcadores de seleção dominantes em fungos

Por não haver estudos de transformação genética em *Fonsecaea*, nada se sabia sobre sua susceptibilidade aos compostos usados como marcadores de seleção dominantes em outros fungos. O teste de susceptibilidade foi importante para determinação da concentração mínima inibitória de cada composto utilizado neste trabalho para que fosse possível a seleção de transformantes após as transformações. Conforme a figura 12 demonstra a cepa selvagem de *Fonsecaea* CBS 271.37 é extremamente suscetível aos antibióticos Higromicina B e Nourseotricina, sendo assim foi estabelecida a concentração mínima para a seleção de transformantes de 50  $\mu\text{g/mL}$ ; *Fonsecaea* apresentou uma certa resistência ao antibiótico Neomicina, uma vez que a cepa selvagem cresceu nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , assim sendo para este antibiótico foi estabelecida a concentração mínima para seleção de transformantes de 100  $\mu\text{g/mL}$  conforme demonstra a figura 12. Vale ressaltar que as placas foram submetidas a crescimento até 30 dias para que fosse observado o aparecimento de colônias resistentes naturais.

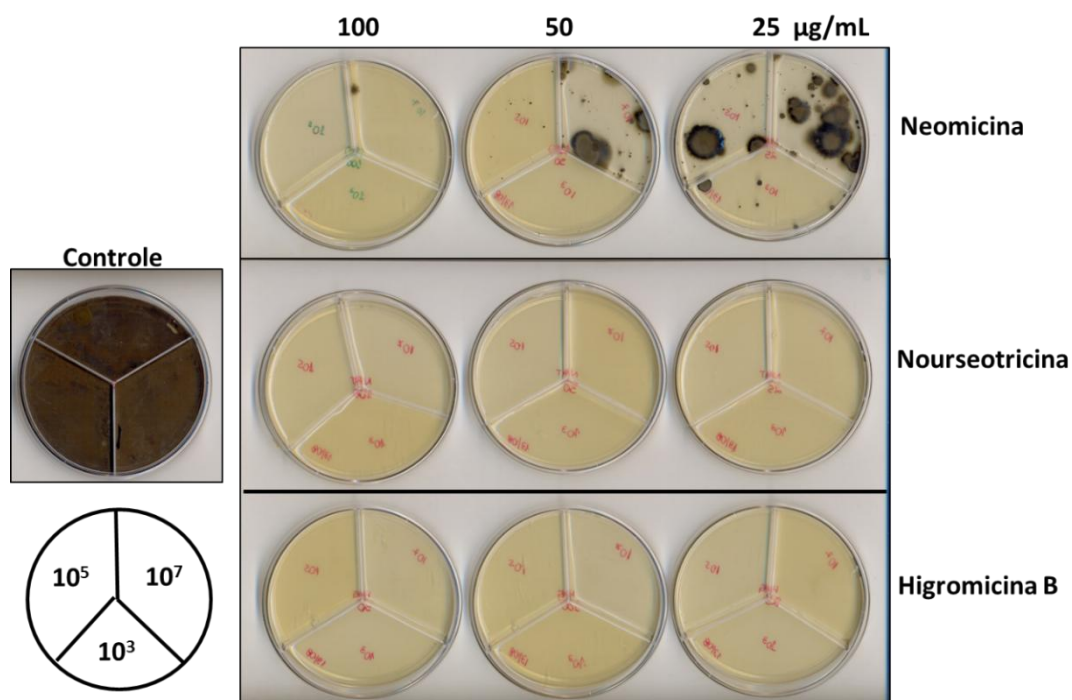
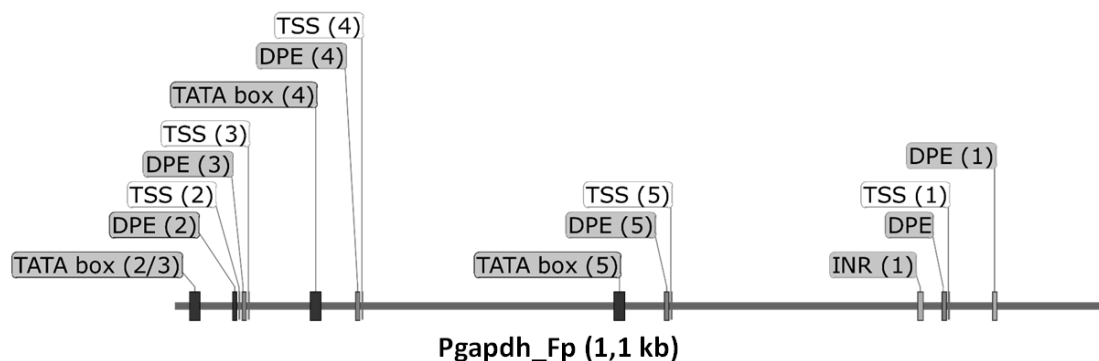


Figura 12: Teste de susceptibilidade de *F. pedrosoi* CBS 271.37 a Neomicina, Nourseotricina e Higromicina B. Foram plaqueados  $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$  conídios em diferentes concentrações das drogas (0, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). As placas foram incubadas a 25 °C por 30 dias.

## 5.2. Construção dos cassetes de resistência às drogas Higromicina B, Neomicina e Nourseotricina para transformação genética de *F. pedrosoi*

### 5.2.1. Obtenção do Cassete *hygR*

Com a determinação da concentração mínima inibitória dos antibióticos para seleção de transformantes de *Fonsecaea*, foi possível construir cassetes contendo os genes de resistência *hph*, *nat* e *neo* controlados por promotor e terminador que pudessem ser reconhecidos por *F. pedrosoi*. As etapas que foram realizadas para construção dos cassetes utilizando PCR de sobreposição estão descritas em materiais e métodos (Fig. 5, pág. 41). O promotor do gene *gapdh* de *F. pedrosoi* foi escolhido para controle do cassete de resistência, uma vez que este promotor é muito utilizado para este fim em fungos filamentosos ascomicetos (Punt *et al.*, 1990). A região de 1 kb acima da ORF de *gapdh* foi testada *in silico* pela ferramenta YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor que utiliza algoritmos para avaliação de potenciais elementos canônicos encontrados em promotores de eucariotos que se ligam a fatores transcricionais. Dentre os elementos identificados estão: Inr (iniciadores que contém sítio de iniciação de transcrição), TATA box (Sequência rica em A / T, localizada tipicamente cerca de 20 a 30 nucleotídeos a montante do local de início da transcrição, que está ligada a proteína de ligação TATA – TBP - do complexo contendo o Fator de Transcrição), e DPE (Downstream Promoter elements, está a jusante de TATA box e é importante para transcrição basal, pois auxilia no direcionamento da localização do complexo de pré-iniciação da transcrição). Após análise *in silico* da sequência de 1 kb correspondente ao *gapdh* de *F. pedrosoi* o programa identificou 5 possíveis combinações de elementos canônicos que tiveram “score” acima do *cutoff* de 0,8 e estão representados na figura 13. Assim, com base nestes dados esta região foi amplificada do genoma de *F. pedrosoi* CBS271.37 para a construção do cassete para conferir resistência a Higromicina B.



	Motivo	Posição	Sequencia	Motivo	Posição	Sequencia	Score combinado	Sítio Início transcrição (TSS)
1	INR	924	CCACTTT	DPE	953	AGTTG	1.89	925
2	TATA	55	CGGATAAAACT	DPE	106	GGTTC	1.79	78
3	TATA	55	CGGATAAAACT	DPE	117	AGACA	1.86	89
4	TATA	199	TTCATAAATATG	DPE	253	AGTTG	1.81	225
5	TATA	562	CTTATAAATATC	DPE	622	AGATA	1.87	594

Figura 13: Representação esquemática do promotor *Pgapdh* de *F. pedrosoi* contendo a combinação dos potenciais elementos canônicos encontrados em promotores de eucariotos que se ligam a fatores transcricionais identificados pelo programa YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor. Inr: iniciadores que contém sítio de iniciação de transcrição, TATA box: Sequência rica em A / T, localizada tipicamente cerca de 20 a 30 nucleotídeos a montante do local de início da transcrição, DPE: Downstream Promoter elements e TSS: sítio de início da transcrição.

A construção do cassete de resistência a Higromicina B se deu pela amplificação dos seguintes fragmentos: *FpPgapdh* de 1,1 kb com oligonucleotídeos Fp 7 e Fp 6, gene de resistência *hph* de 1 kb, usando Fp 1 e Fp 2 e um fragmento de 0,34 kb correspondente *FpTrpC*, usando Fp 2 e Fp 3 (Figura 14A). A amplificação final do cassete por PCR de sobreposição resultou no fragmento de 2,46 kb corresponde a fusão *FpPgapdh::hph::FpTrpC* (figura 14B). Este cassete foi clonado no plasmídeo pBluescript KS+ nos sítios de *BamHI* e *EcoRV*, sendo estas mesmas enzimas usadas para confirmação da inserção do cassete no plasmídeo. A figura 14C demonstra a correta inserção do cassete nos plasmídeos 1, 2, 3, 4, 5, 6 que foram denominados pFpHYG. O clone dois foi escolhido aleatoriamente para a transformação de *F. pedrosoi* por biobalística.

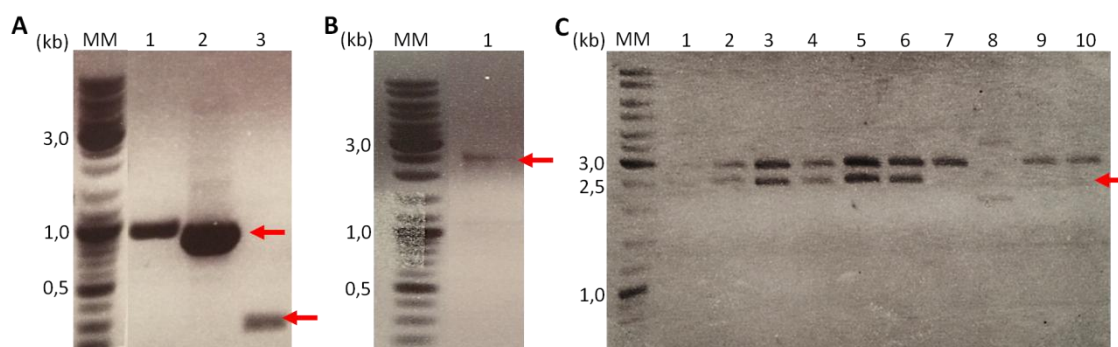


Figura 14: Resultado das etapas de construção do cassete de resistência a Higromicina B (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos fragmentos amplificados *FpPgapdh* 1,1 kb (1), *hph* 1,0 kb (2), *FpTrpC* 0,34 kb (3). (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% do fragmento obtido pela PCR de sobreposição *FpPgapdh::hph::FpTrpC* - 2,4 kb (1) (C) Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos (1-10) obtidos após clonagem do cassete em pBluescript KS+ digeridos com *BamHI* e *EcoRV*. Os clones considerados positivos foram 1, 2, 3, 4, 5, 6 denominados pFpHYG. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

### 5.2.2. Construção dos cassetes de Resistência a Nourseotricina e Neomicina

Após o teste de susceptibilidade aos antibióticos terem apontado Nourseotricina e Neomicina como possíveis marcadores de dominância positiva a serem usados para transformação genética de *F. pedrosoi*, decidiu-se construir os cassetes de resistência contendo sequências promotora e terminadora de ascomicetos. Previamente, o nosso grupo observou que o plasmídeo pSILENT-1 (Nakayashiki *et al.*, 2005) que contém *hph* sob controle de *AnPtrpC* e *AnTtrpC* era expresso em *F. pedrosoi*. Assim, por *AnPtrpC* apresentar tamanho pequeno (0,37 kb), o que facilitará as etapas futuras de construção dos cassetes de deleção gênica, este foi escolhido para controle dos genes *nat* e *neo*. O método utilizado para construção do cassete foi baseado na PCR de sobreposição. A figura 15 apresenta as etapas de amplificação que culminaram na construção do cassete de resistência, como descrito em materiais e métodos. Como terminador, escolheu-se a sequência de 0,42 kb a jusante do códon de terminação do gene que codifica actina de *F. pedrosoi*. Os dois cassetes *natR* e *neoR* foram construídos com as sequências *AnPtrpC* e *FpTact*. Assim, 0,37 kb do promotor de *AnPtrpC* foi amplificado de pSILENT-1, com oligonucleotídeos Fp 86 e Fp 87, enquanto que o terminador *FpTact* apresentou um fragmento de 0,42 kb após amplificação usando DNA genômico de *F. pedrosoi* e oligonucleotídeos Fp 85 e Fp 81 (Figura 15A). Os fragmentos contendo os genes de resistência *nat* e *neo* foram amplificados usando os oligonucleotídeos Fp 82 e Fp 83 a partir dos plasmídeos pPZPNAT e pPZPNEO (Walton *et al.*, 2006),



respectivamente. Os produtos *nat* (0,72 kb) e *neo* (0,93 kb) foram utilizados para PCR de sobreposição (Figura 15B e 16B) e os cassetes foram amplificados e clonados em pGEMT-Easy. Os clones obtidos foram digeridos com *EcoRI* ou *NotI* para liberação dos insertos e confirmação da clonagem (Figura 15C e 16C) e assim foram nomeados pFpNAT e pFpNEO.

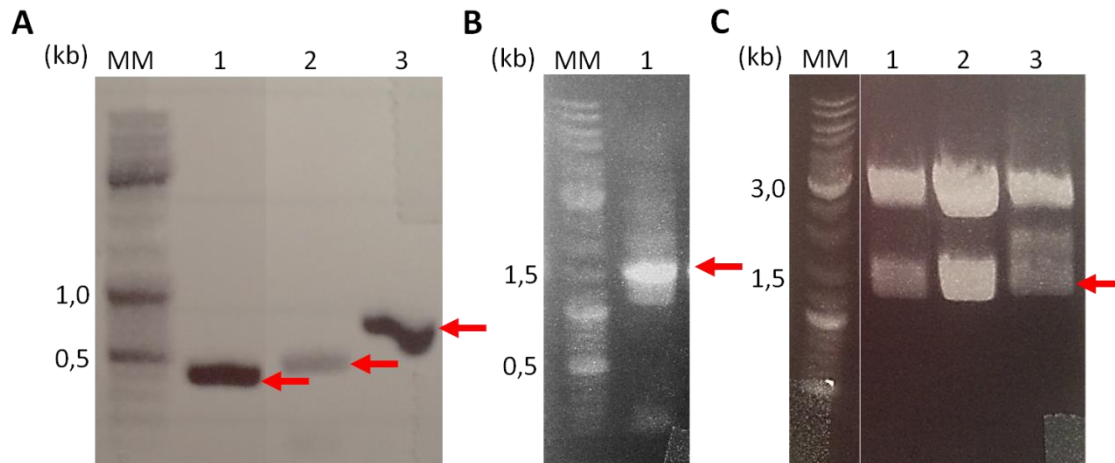


Figura 15: Resultado das etapas de construção do cassete de resistência a Nourseotricina (A) Eletroforese em gel de agarose a 0,8% com os fragmentos amplificados *AnPtrpC* 0,37 kb (1), *FpTact* 0,42 kb (2), *nat* 0,72 kb (3). (B) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % da PCR de sobreposição para obtenção do cassete *AnPtrpC::nat::FpTact* 1,5 kb (1) (C) Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos (1-3) com *EcoRI*. Os clones considerados positivos foram 1e 2 denominados pFpNAT. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

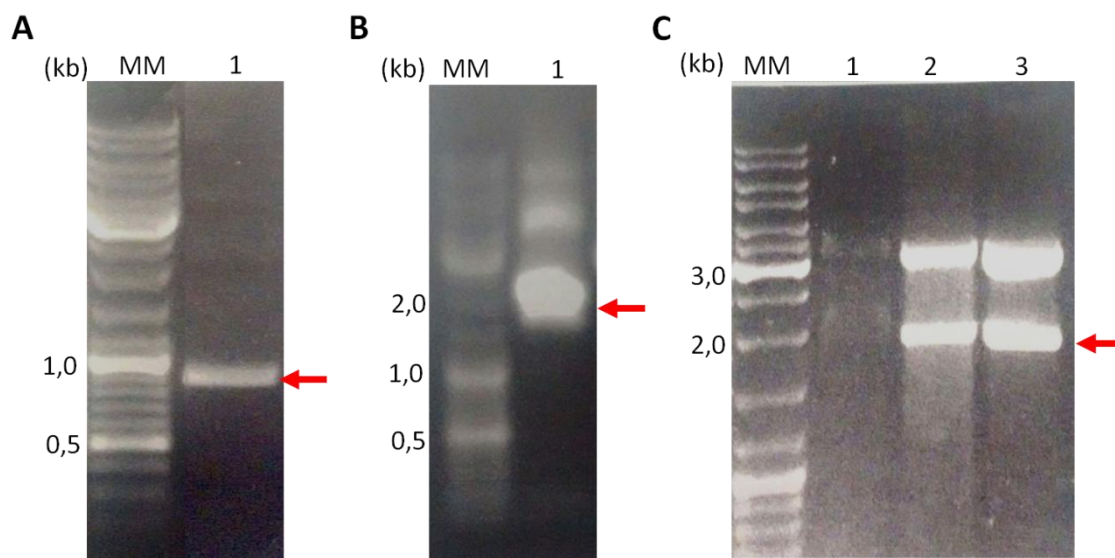


Figura 16: Resultado das etapas de construção do cassete de resistência à Neomicina (A) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % com o fragmento amplificado *neo* 0,93 kb (3). (B) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % da PCR de sobreposição para obtenção do cassete *AnPtrpC::neo::FpTact* 1,7 kb (1) (C) Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos (1-3) com *NotI*. Os clones considerados positivos foram 2 e 3 denominados pFpNEO. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

### 5.2.3. Construção do plasmídeo contendo cassete *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* para transformação via *Agrobacterium*

Para a inserção do cassete de resistência à Higromicina B no plasmídeo específico para *Agrobacterium* utilizou-se o plasmídeo pPZPNAT (Walton *et al.*, 2006), para isso foi necessário retirar a marca natR (figura 17A) pela digestão com *EcoRI* e após re-circularização nova digestão com *BamHI* e *SalI* foi realizada para clonagem do cassete. A Figura 17B, apresenta os plasmídeos pZPERI e pFpHYG, digeridos com *BamHI* e *SalI* para purificação dos fragmentos e ligação. Os clones obtidos foram digeridos com *BamHI* e *SalI* para confirmação da inserção do cassete *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* no plasmídeo pZPERI, e das amostras escolhidas (1-10) somente uma não apresentou o inserto do tamanho esperado, as outras nove apresentaram 6,8 kb referente ao plasmídeo e o 2,4 kb que corresponde ao cassete de resistência à Higromicina B. Após a confirmação foi escolhido um dos plasmídeos, e este foi transformado na linhagem EHA105 de *Agrobacterium* para avaliação deste sistema de transformação de *F. pedrosoi*.

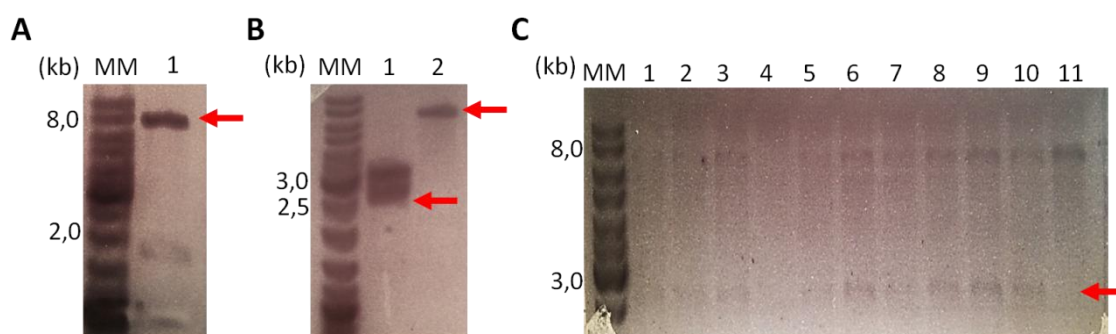


Figura 17: Resultado das etapas de construção do plasmídeo pZPFpHPH para transformação genética via *Agrobacterium* contendo cassete que confere resistência a Higromicina B. (A) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % da digestão com *EcoRI* do plasmídeo pPZPNAT para liberação do cassete natR (1,7 kb). O plasmídeo sem marca de seleção de 6,8 kb foi denominado de pZPERI, foi purificado e religado (1) Plasmídeo pPZPNAT digerido com *EcoRI*. (B) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % da digestão com *BamHI* e *SalI* dos plasmídeos (1) pFpHYG para liberação do inserto (cassete *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* de 2,4 kb) e (2) pZPERI (6,8 kb), que foram purificados e ligados. (C) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % da digestão com *BamHI* e *SalI* dos plasmídeos pZPFpHPH, sendo todos positivos, exceto o clone 4, por apresentarem o fragmento correspondente ao cassete de 2,4 kb e ao vetor de 6,8 kb; (11) pZPERI (6,8 kb). MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

### 5.3. Avaliação dos parâmetros que podem afetar Biobalística e obtenção dos transformantes resistentes a Higromicina B

O método de transformação genética por biobalística já é utilizado em outros fungos e os parâmetros que afetam este sistema foram primeiramente avaliados em fungos por Armaleo *et al.*, (1990) e incluem os físicos: constituição, tamanho, concentração e preparo das partículas carreadoras do DNA e os biológicos: genótipo e fase de crescimento da célula alvo, densidade celular que será bombardeada e composição osmótica do meio de cultura usado durante o bombardeamento. Os trabalhos recentes de biobalística de fungos normalmente costumam avaliar parâmetros como a distância entre o disparo e o alvo, o tipo celular a ser transformado, que no caso de fungos filamentosos, conídios intactos ou germinados, pressão de gás Hélio e quantidade de células alvos.

Neste trabalho, nos experimentos de biobalística, foram utilizadas partículas de tungstênio para carrear o DNA, diâmetro médio 0,7  $\mu\text{m}$  e  $10^9$  conídios de *F. pedrosoi* não germinados foram inoculados por placa, sem adição de estabilizador osmótico. Decidiu-se avaliar os parâmetros da distância dos carreadores de partículas até as células alvo, de seis cm e nove centímetros, e o tempo de incubação para a recuperação das células de 24 e 48 horas. Após uma sucessão de experimentos independentes, o número de transformantes foi avaliado por testes estatísticos para identificação dos melhores parâmetros para transformar geneticamente *F. pedrosoi*. Como controle positivo para a transformação, foi usado o plasmídeo pAN7.1 que apresenta sequências de *A.nidulans* controlando o gene *hph*.

A figura 18A apresenta o número de transformantes obtidos para cada uma das condições testadas utilizando o plasmídeo construído com promotor e terminador do próprio fungo, o plasmídeo pFpHYG, enquanto que a figura 18B, representa os dados obtidos pela transformação com o plasmídeo pAN7.1. Devido ao desvio padrão das amostras terem sido altos, os testes estatísticos não acusaram diferença significativa entre as condições avaliadas: (1) distância das partículas às células alvo – 6 e 9 cm e (2) tempo de recuperação das células após bombardeamento 24 e 48 h. Entretanto, tanto os dados obtidos com o plasmídeo pFpHYG quanto aqueles gerados pelo pAN7.1, foi possível observar que, disparos na distância de 6 cm e tempo de recuperação das células de 24 horas, proporcionaram um maior número de colônias transformantes. A média de

transformantes é demonstrada na tabela 5. Estes dados sugerem que os métodos de transformação testados neste estudo, obtiveram uma eficiência similar entre o plasmídeo pFpHYG comparado ao plasmídeo pAN7.1, que já é utilizado para transformação de outros fungos filamentosos (Meyer *et al.*, 2003; Yu e Cole, 1998).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os melhores parâmetros para transformar *Fonsecaea* por biobalística. Experiências de outros grupos de pesquisa demonstram que embora muitos sistemas de transformação estejam disponíveis para fungos filamentosos, nem todos são adequados para um organismo, sendo assim sistemas apropriados devem ser testados e otimizados para cada fungo. Trabalhos como de Meyer *et al.*, (2003), avaliaram vários parâmetros para testar a melhor condição para transformar por biobalística *A. giganteus*, entre elas está a variação da distância entre o disparo e o alvo (2,5 até 17, 5 cm) com a combinação de diferentes pressões de gás Hélio. Meyer e companheiros (2003) observaram que uma baixa pressão de gás hélio combinado com uma distância muito grande (15-17 cm) entre o disparo e alvo gera uma baixa eficiência de transformantes, já Te'o *et al.*, (2002) utilizando combinação de uma distância de 3 cm e pressão de Hélio de 1.350 psi para transformação de *T. reseei* obtiveram um maior número de transformantes o que corrobora com os achados deste trabalho aonde se observou que a média de transformantes por  $\mu\text{g}/\text{DNA}$  (tabela 5) é maior nos disparos de 6 cm e o tempo de recuperação em meio não seletivo de vinte e quatro horas, confirmando que quanto menor a distância entre as partículas e o alvo melhores as chances de se conseguir maior número de transformantes.

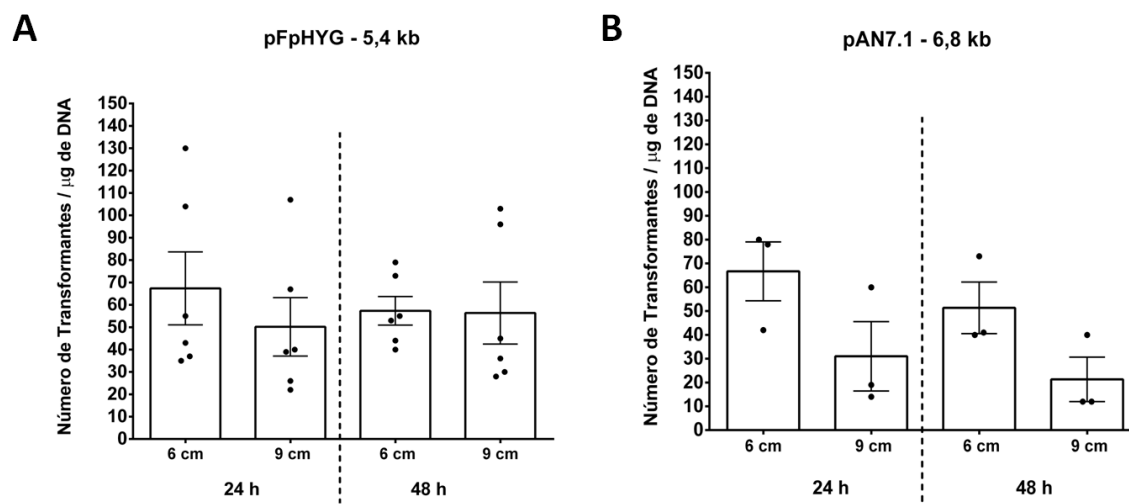


Figura 18: Eficiência da transformação biobalística em *F. pedrosoi* com os plasmídeos pFpHYG e pAN7.1 em função das condições testadas. (A) pFpHYG e (B) pAN7.1. Foram avaliadas duas variáveis: distância das partículas às células alvo e tempo de recuperação das células após bombardeamento. A linha pontilhada separa os grupos por tempo. As barras representam o erro padrão de cada grupo. Teste estatístico aplicado: two-way ANOVA, *pos-teste*: Tukey. Não houve diferença significativa entre as condições testadas. pFpHYG n = 6 e pAN7.1 n = 3.

**Tabela 5: Número de transformantes de *F. pedrosoi* obtidos por biobalística por  $\mu\text{g}$  de DNA em função dos parâmetros avaliados**

Parâmetros Distância do alvo/ tempo de recuperação em meio não seletivo	pFpHYG		pAN7.1	
	Número mínimo e máximo	Média	Número mínimo e máximo	Média
6 cm/ 24 h	15-130	42	14-80	45
6 cm/ 48 h	6-107	39	6-60	42
9 cm/ 24 h	8-89	35	13-73	26
9 cm/ 48 h	10-103	37	4-40	18

Lorito *et al.*, (1993) observaram em seu trabalho com *T. harzianum* e *G. virens* que as mudanças na pressão de Hélio ou nos parâmetros biológicos (como a idade do conídio e a presença de um estabilizador osmótico) não apresentaram efeito significativo na eficiência da transformação.

A estabilidade mitótica dos transformantes obtidos por biobalística foi avaliada através de três passagens sucessivas em meio não seletivo. A primeira passagem já revelou que dos 62 transformantes selecionados aleatoriamente entre as condições testadas, 12 (17,7%) não foram capazes de crescer em meio seletivo (presença de

Higromicina B). Os transformantes que se mostraram estáveis na primeira passagem mantiveram-se assim até a última (Figura 19).

Neste trabalho os transformantes de *F. pedrosoi* cresceram em meio não seletivo de forma semelhante à linhagem selvagem, incluindo o tempo que levaram para crescer e a morfologia das colônias, no entanto, Lorito *et al.*, (1993) observaram em seu trabalho que os transformantes cresceram de forma mais rápida que a cepa selvagem. No trabalho de Fungaro *et al.*, (1995) entre os transformantes de *A. nidulans* 94% apresentaram crescimento lento, e a estabilidade mitótica foi avaliada após quatro passagens sucessivas e foi concluído que os transformantes eram estáveis. Para o fungo *Botryotinia fuckeliana*, Hilber *et al.*, (1994), selecionaram oito transformantes resistentes à Higromicina B para testar a estabilidade mitótica, passando cinco vezes nos meios seletivos e não seletivos, os transformantes que foram mantidos no meio seletivo do início ao fim mostraram-se completamente estáveis, porém dos oito que foram mantidos em meio não seletivo, quatro deixaram de crescer.

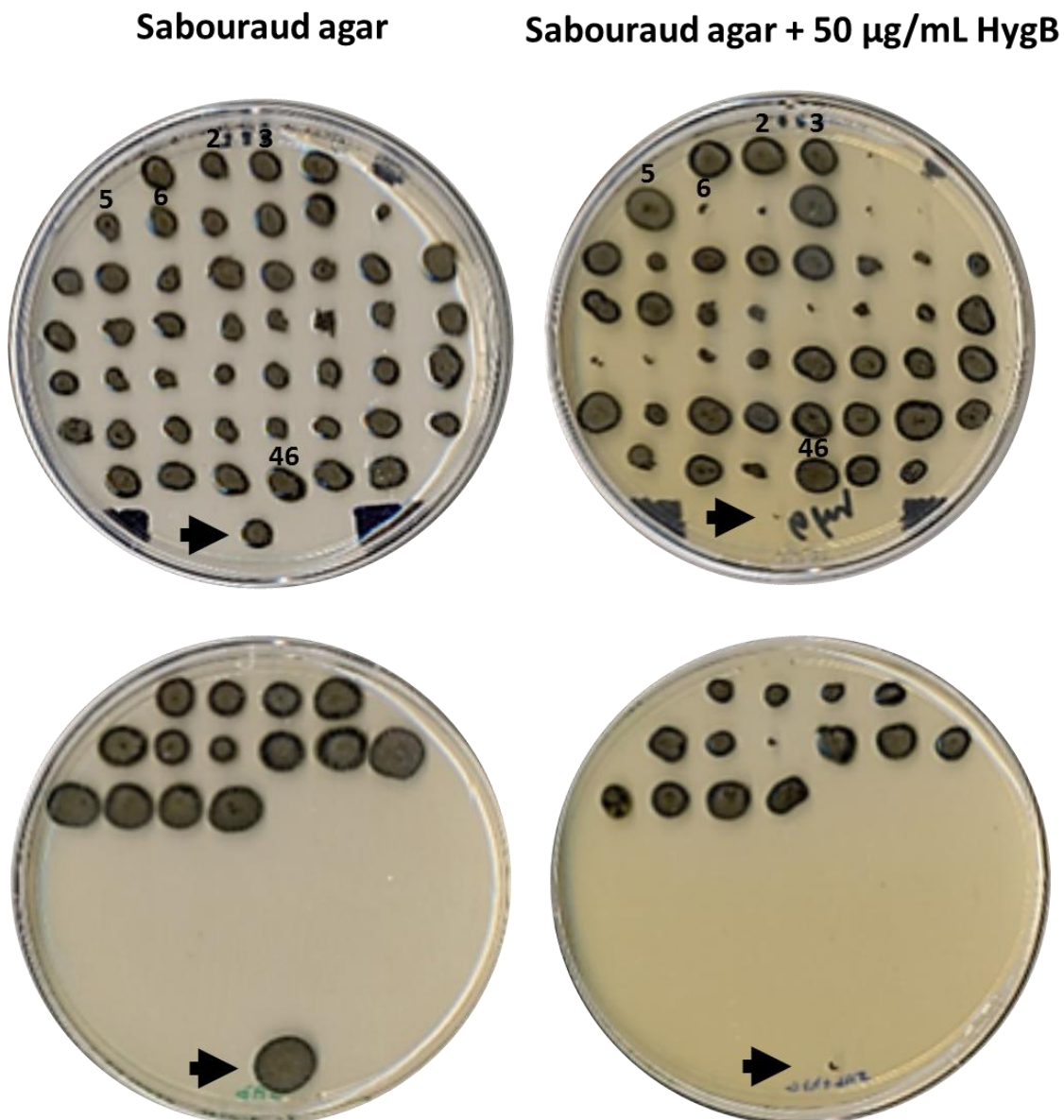


Figura 19: Mutantes de *F. pedrosoi* transformados por biobalística com plasmídeo pFPHYG após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo. Os transformantes foram repicados três vezes consecutivas em meio Sabouraud agar com e sem Higromicina B (50 µg/mL) incubados a 25 °C por 10 dias para checar a estabilidade mitótica. A seta indica o controle CBS 271.37 não transformado. Os números 2, 3, 5, 6 e 46 indicam os transformantes que tiveram o DNA genômico extraído para confirmação da integração do gene *hph* por PCR e Southern Blot.

A transformação do fungo *F. pedrosoi* através de biobalística proporcionou o crescimento de colônias mutantes estáveis em placas de Sabouraud ágar contendo o antibiótico Higromicina B, destas, quatro (2, 3, 5, 46) estáveis e uma não estável (6) foram coletadas e repicadas em meio líquido para extração de DNA genômico para confirmação da presença do gene *hph* no genoma. A figura 20 apresenta o resultado da PCR que indica que todos os cinco transformantes estáveis analisados apresentam o



fragmento de 1 kb referente à amplificação de *hph* usando os oligonucleotídeos Fp 1 e Fp 2, enquanto que o transformante número 6 que não foi capaz de crescer na presença de Higromicina B apresentou 2 fragmentos, sendo um de tamanho aproximado de *hph* e outro de menor tamanho que o esperado indicando possivelmente que ocorreu rearranjo na sequência de *hph* integrada no genoma que tornou possivelmente o gene afuncional.

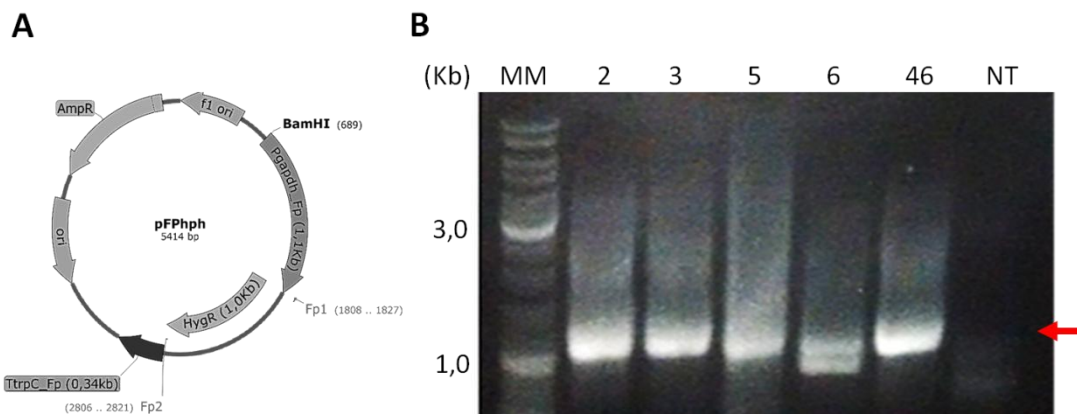


Figura 20: Confirmação da presença do gene de resistência à Higromicina B nos transformantes estáveis de *F. pedrosoi* obtidos por biobalística de pFpHYG. (A) Mapa do plasmídeo pFpHYG indicando a posição dos oligonucleotídeos Fp 1 e Fp 2 utilizados para amplificação do gene *hph* com tamanho esperado de 1 kb. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da PCR de confirmação dos transformantes resistentes a HygB. Os números correspondem aos transformantes escolhidos para extração de DNA genômico, sendo 2, 3, 5 e 46 positivos para *hph* e estáveis mitoticamente, enquanto que o transformante 6 apresentou dois fragmentos e mostrou-se incapaz de crescer na presença do antibiótico. NT corresponde ao controle negativo CBS 271.37 não transformado que não apresentou amplificação. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

#### 5.4. Uso de neomicina e nourseotricina como marcadores de seleção dominantes no sistema de transformação genética por biobalística

O uso de outros marcadores seletivos diferentes de *hygR* têm sido amplamente explorados em sistemas eucarióticos. Em fungos, o uso de marcas como *nat* e *neo/G418* vem abrindo novas estratégias e desenhos experimentais no estudo funcional de genes, uma vez que combinados, os marcadores podem ser utilizados para construções de cassetes de deleção ou marcação de múltiplos genes (Sureka *et al.*, 2014; Hentges *et al.*, 2005; Matsunaga *et al.*, 2017, Alshahni *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2005), além disto, estes marcadores por serem dominantes não são restritos a uma única espécie. A escolha do promotor *trpC* da via de biossíntese de triptofano de *A. nidulans* para controle destes marcadores baseou-se no fato de que outros grupos vêm empregando esta sequência para controle de cassetes por ser efetiva na regulação da transcrição de vários fungos



filamentosos (Hamer *et al.*, 1987; Nakayashiki *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2012; sureka *et al.*, 2014).

Após o estabelecimento das condições para transformação genética por biobalística, os plasmídeos pFpNEO e pFpNAT, construídos neste trabalho, foram inseridos em *F. pedrosoi*. Os transformantes obtidos foram avaliados quanto a estabilidade mitótica (figura 21) e posterior extração de DNA e amplificação do gene de resistência. De um total de quarenta e oito mutantes natR selecionados, dezoito (37,5%), não conseguiram crescer em meio seletivo contendo 50 µg/mL de Nourseotricina, após três passagens em meio não seletivo (Figura 21). Diferente do que foi observado para *nat*, de 48 mutantes neoR selecionados, 100% permaneceram estáveis mitoticamente após sucessivas passagens em meio não seletivo (Figura 23). A concentração usada para seleção dos mutantes neoR foi de 100 µg/mL, já que os testes de susceptibilidade indicaram que *F. pedrosoi* apresentava certa resistência ao mesmo uma vez que nas concentrações de 25 e 50 µg/mL foram observadas colônias (Figura 12). O uso de concentrações de Neomicina acima de 100 µg/mL para seleção dos transformantes de *F. pedrosoi* neoR poderá identificar possíveis falsos positivos.

Foi avaliada a presença dos genes de resistência *neo* e *nat* no genoma dos transformantes escolhidos aleatoriamente resistentes à Neomicina e Nourseotricina dentre os que tiveram crescimento em todas as etapas do teste de estabilidade mitótica. Os transformantes natR escolhidos foram 1, 6, 17, 22 e 40, sendo que o 6 apesar de ter crescido em meio seletivo, não apresentou o fragmento esperado de 0,7 kb referente ao gene de resistência (Figura 22). No caso dos mutantes neoR, quatro foram escolhidos: 5, 19, 36 e 46, e o de número 19 também não apresentou o fragmento esperado de 0,9 kb (Figura 24). Assim, apesar de terem gerado transformantes falsos positivos, os marcadores de seleção *neo* e *nat* se mostraram funcionais em *F. pedrosoi* e poderão ser aplicados para construções diversas neste modelo biológico.

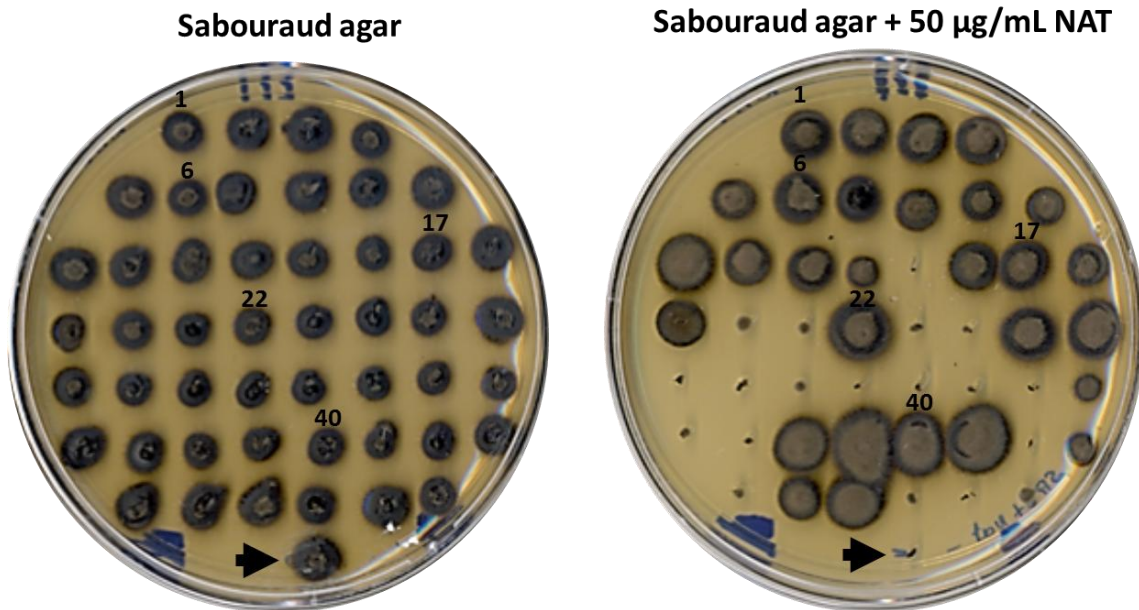


Figura 21: Mutantes de *F. pedrosoi* transformados por biobalística com plasmídeo pFPNAT após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo. Os transformantes foram repicados três vezes consecutivas em meio Sabouraud agar com e sem Nourseotricina (50 µg/mL), incubados a 25 °C por 10 dias para checar a estabilidade mitótica; a seta indica o controle CBS 271.37 não transformado. Os números 1, 6, 17, 22 e 40 indicam os transformantes que tiveram o DNA genômico extraído para confirmação da integração de *natR* por PCR.

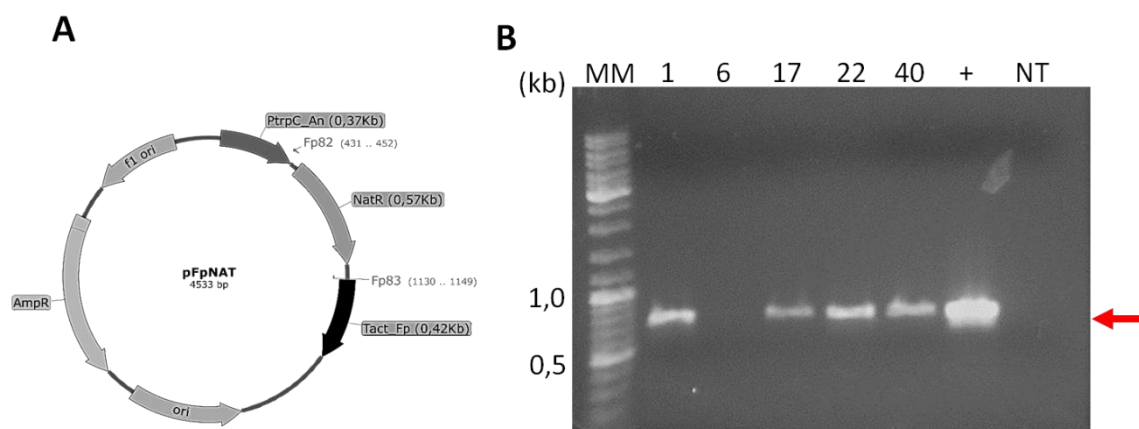


Figura 22: Confirmação da presença do gene de resistência à Nourseotricina nos transformantes estáveis de *F. pedrosoi* obtidos por biobalística de pFPNAT. (A) Mapa do plasmídeo pFPNAT indicando a posição dos oligonucleotídeos Fp 82 e Fp 83 utilizados para amplificação do gene *nat* com tamanho esperado de 0,7 kb. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da PCR de confirmação dos transformantes *natR*. Os números correspondem aos transformantes escolhidos para extração de DNA genômico, sendo 1, 17, 22 e 40 positivos para amplificação e estáveis mitoticamente, enquanto que o transformante 6 não apresentou o fragmento esperado embora foi capaz de crescer na presença do antibiótico. NT corresponde ao controle negativo CBS 271.37 não transformado que não apresentou amplificação. (+) corresponde ao controle positivo pFPNAT. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

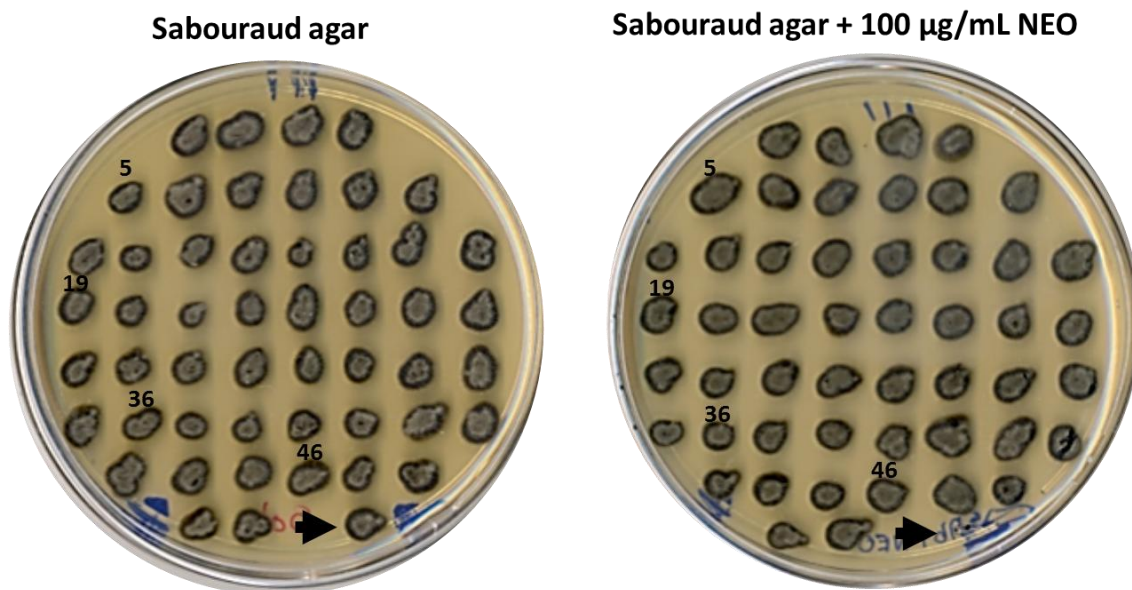


Figura 23: Mutantes de *F. pedrosoi* transformados por biobalística com plasmídeo pFPNEO após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo. Os transformantes foram repicados três vezes consecutivas em meio Sabouraud agar com e sem Neomicina (100 µg/mL), incubados a 25 °C por 10 dias para checar a estabilidade mitótica; a seta indica o controle CBS 271.37 não transformado. Os números 5, 19, 36 e 46 indicam os transformantes que tiveram o DNA genômico extraído para confirmação da integração do gene *neo* por PCR.

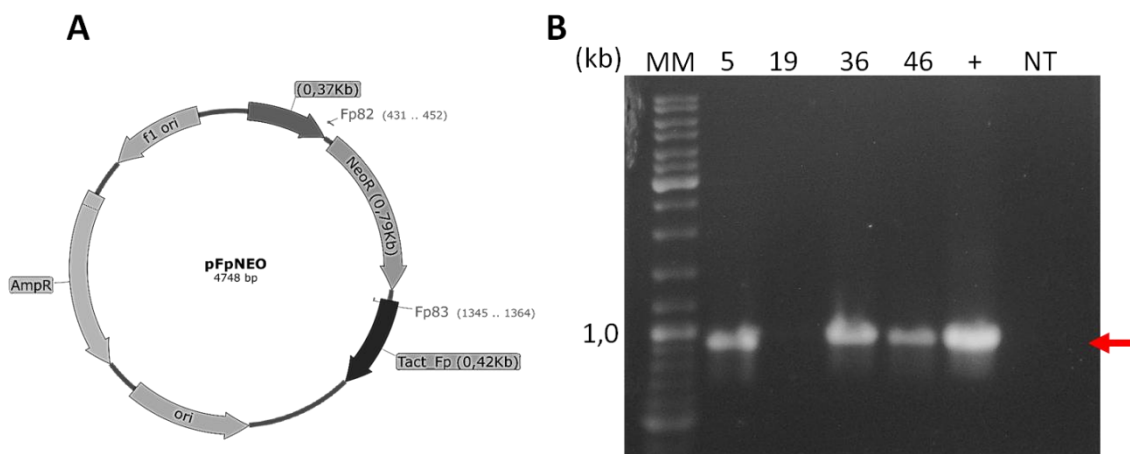


Figura 24: Confirmação da presença do gene de resistência à Neomicina nos transformantes estáveis de *F. pedrosoi* obtidos por biobalística de pFPNEO. (A) Mapa do plasmídeo pFPNEO indicando a posição dos oligonucleotídeos Fp82 e Fp83 utilizados para amplificação do gene *neo* com tamanho esperado de 0,9 kb. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da PCR de confirmação dos transformantes neoR. Os números correspondem aos transformantes escolhidos para extração de DNA genômico, sendo 5, 36 e 46 positivos para amplificação e estáveis mitoticamente, enquanto que o transformante 19 não apresentou o fragmento esperado embora foi capaz de crescer na presença do antibiótico. NT corresponde ao controle negativo CBS 271.37 não transformado que não apresentou amplificação. (+) corresponde ao controle positivo pFPNEO. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

### 5.5. Obtenção do mutante GFP de *F. pedrosoi*

As proteínas fluorescentes como GFP, dsRed, mCherry, entre outras para marcação de microrganismos, e construção de linhagens repórter vêm sendo muito utilizadas em microrganismos patogênicos pois possibilita o monitoramento de células vivas do patógeno de forma a acompanhar a dinâmica espacial em tempo real da colonização e interação com as células e tecidos do hospedeiro (Maor *et al.*, 1998, Bloemberg e Camacho-Carvajal, 2006, Bosch *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2016, Korani *et al.*, 2017).

Os mutantes GFP de *F. pedrosoi* foram obtidos através de biobalística usando o protocolo previamente padronizado e o vetor contendo o gene *gfp* que codifica a proteína verde fluorescente e a marca *hygR*. Foi realizado o teste de estabilidade mitótica com os transformantes (Figura 25), e após três passagens em meio seletivo e não seletivo, todos mantiveram-se estáveis. Os 35 transformantes foram avaliados microscopicamente se eram capazes de emitir fluorescência e destes, 9 foram positivos para GFP, sendo que os mutantes que apresentaram fluorescência emitida com maior intensidade estão indicados na Figura 25C.

Foi realizada a amplificação do gene *hph* nos mutantes positivos para GFP: 3, 11, 28 e 31 e 30 que não apresentou fluorescência ao microscópio, mas era estável após passagens em meio não seletivo. O resultado mostrou que todos os mutantes apresentaram o gene *hph*, embora um mutante não tenha expressado a proteína GFP (Figura 25B). Outros trabalhos que utilizam a técnica de biobalística reportam alterações e rearranjos plasmidiais prévios à integração no DNA alvo que podem explicar a ausência de expressão de GFP (Inglis *et al.*, 2000).

Aboul-Soud *et al.*, (2004) utilizaram o mesmo plasmídeo para obtenção de mutante fluorescente de *F. oxysporum* e relataram forte expressão de GFP distribuída no citoplasma (ausente no núcleo) das hifas transformadas, e que esta expressão foi variável entre os transformantes e que vários não apresentaram fluorescência detectável, comparável a linhagem selvagem, assim como foi observado para *F. pedrosoi* neste trabalho.

Dentre as vantagens destacadas do uso de GFP como marcador fluorescente estão: GFP é resistente à degradação pela luz (Cubitt *et al.*, 1995), tem baixa toxicidade, e não requer substrato para fluorescer pois sua formação é decorrente de mecanismo auto catalítico (Aboul-Soud *et al.*, 2004). Considerando a carência de estudos moleculares e dinâmicos para o entendimento da biologia e dos mecanismos de patogenicidade de *F. pedrosoi*, o uso de linhagem marcada com GFP pode ser de grande relevância para os estudos da interação deste fungo com o hospedeiro humano e com a planta – seu potencial reservatório no ambiente.

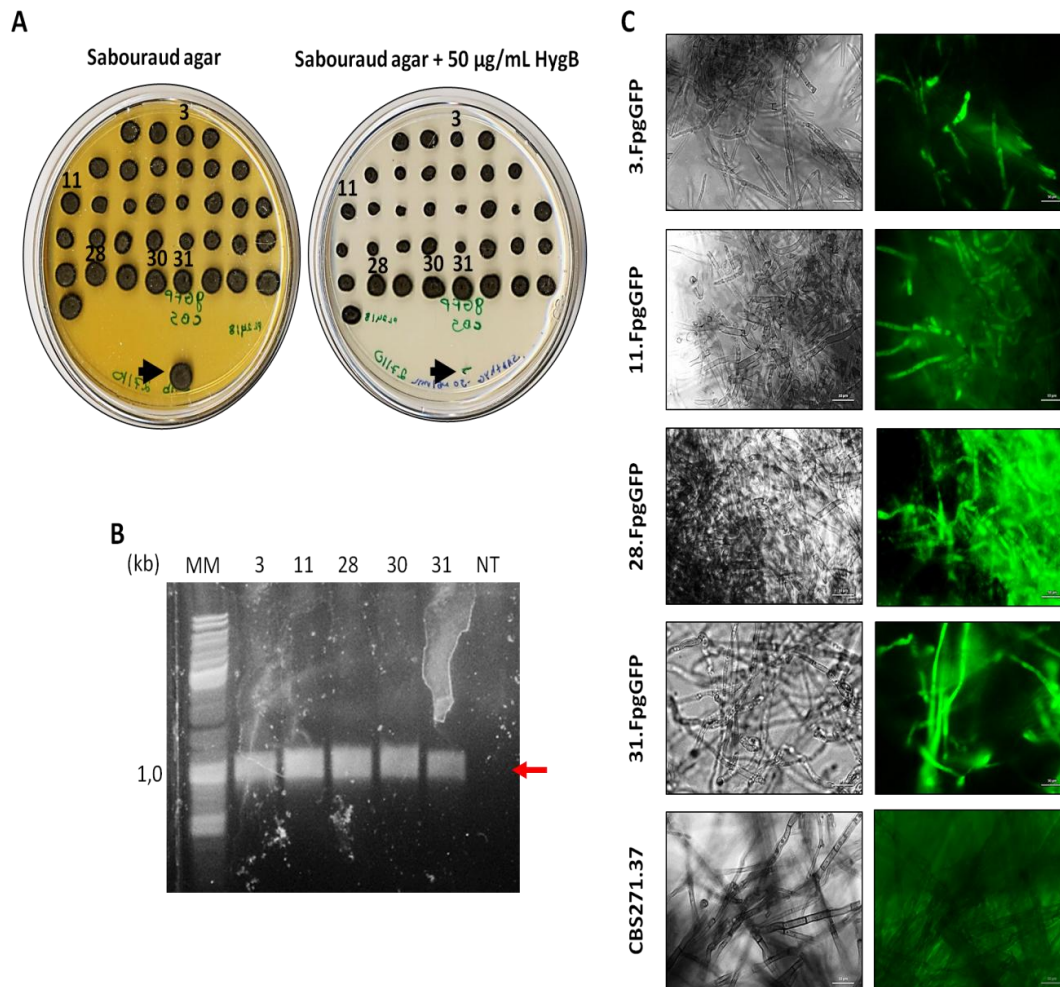


Figura 25: Obtenção dos transformantes que expressam GFP de *F. pedrosoi* utilizando o vetor gGFP (Maor *et al.*, 1998). (A) Mutantes de *F. pedrosoi* transformados por biobalística com plasmídeo gGFP após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo. Os transformantes foram repicados três vezes consecutivas em meio Sabouraud agar com e sem Higromicina B (50 µg/mL), incubados a 25 °C por 10 dias para checar a estabilidade mitótica; a seta indica o controle CBS 271.37 não transformado. Os números 3, 11, 28, 30 e 31 indicam os transformantes que tiveram o DNA genômico extraído para confirmação da integração do gene *hph* por PCR. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da PCR de confirmação dos transformantes *hygR*, tamanho esperado 1kb (Oligonucleotídeos Fp1 e Fp 2). Os números correspondem aos transformantes escolhidos, sendo 3, 11, 28 e 31 positivos para amplificação, estáveis mitoticamente e apresentaram fluorescência verde ao microscópio, enquanto que o transformante 30, apesar de ter apresentado o gene de resistência *hph*, não se apresentou fluorescente. NT corresponde ao controle negativo CBS 271.37 não transformado que não apresentou amplificação. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo). (C) Análise de fluorescência dos transformantes gGFP por microscopia de fluorescência e DIC. Imagens captadas utilizando o microscópio Axiovert 100, Carl Zeiss com o filtro 38 HE (verde).

## 5.6. Avaliação dos parâmetros do sistema de transformação por *Agrobacterium* e obtenção dos transformantes resistentes à Higromicina B

A utilização de transformação genética mediada por *Agrobacterium* já é usada em vários fungos filamentosos, dentre eles *Ascochyta rabiei*, *A. fumigatus*, *C. cladosporioides* (Sugui *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011. White & Chen., 2006), entre



outros. As linhagens de *Agrobacterium* são muitas, e as mais utilizadas nos trabalhos são LBA4404, AGL-1 e EHA105 (empregada neste trabalho). Os parâmetros que podem afetar a transformação por *Agrobacterium* são: as condições de co-cultivo (como proporção entre bactéria e fungo), o tempo e a temperatura de incubação e a linhagem de *Agrobacterium* (Shao *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2004).

Nos experimentos deste trabalho utilizando *Agrobacterium* e conídios de *F. pedrosoi*, os parâmetros avaliados foram o tempo de co-cultivo e a proporção entre *Agrobacterium* e o fungo. Das linhagens de *Agrobacterium* utilizadas para a transformação, a LBA4404 não apresentou nenhuma colônia após diferentes tentativas de transformação. Outros autores como Nakamura *et al.*, (2012) e Fang *et al.*, (2006), também não tiveram sucesso com essa linhagem, assim os testes seguiram somente com a linhagem EHA105.

A figura 26 apresenta o número de transformantes obtidos em função das condições testadas para a transformação, utilizando o plasmídeo construído com promotor e terminador do próprio *Fonsecaea* (plasmídeo pZPFpHPH) e o plasmídeo pAD1625 que contém promotor de *Neurospora* controlando a expressão do gene *hph* (controle). Nestes experimentos as proporções bactéria: fungo de  $1:1 \times 10^8$  e  $10:1 \times 10^8$  foram avaliadas após o tempo de co-cultivo de 72 horas. Após a aplicação do teste estatístico One-Way ANOVA, foi observado que não houve diferença estatística em relação às taxas de co-cultivo para cada plasmídeo utilizado. Contudo, é possível observar que tanto para o plasmídeo pAD1625 quanto pZPFpHPH, a proporção de co-cultivo que resultou em um maior número de células transformantes foi de  $10:1 \times 10^8$  (Tabela 6). Também foi possível observar, segundo a figura 22, que a transformação com o plasmídeo pAD1625 proporcionou um maior número de transformantes sendo estatisticamente significativa a diferença em relação ao plasmídeo pZPFpHPH.

Uma possível explicação para maior eficiência de transformação de *F. pedrosoi* obtida usando o plasmídeo pAD125 (*background* pTiA6) pode ser atribuída ao fato de que este plasmídeo apresenta duas mutações: os genes *vir* constitutivamente expressos (*virGN54D*) e replicon *75Δ2* que promove alto número de cópias do plasmídeo (Abuodeh *et al.*, 2000). Estas alterações, assim como neste trabalho com *F. pedrosoi*, geraram maior número de transformantes em plantas (Hansen *et al.*, 1994). Além disto,

vale ressaltar que o cassete de resistência a Higromicina B está controlado pelo promotor de *cpc-1* de *Neurospora*, que pode ser mais expresso do que o Promotor de *gapdh* de *F. pedrosoi* que foi selecionado para uso no plasmídeo pPZPFpHPH (*background* pPZP201).

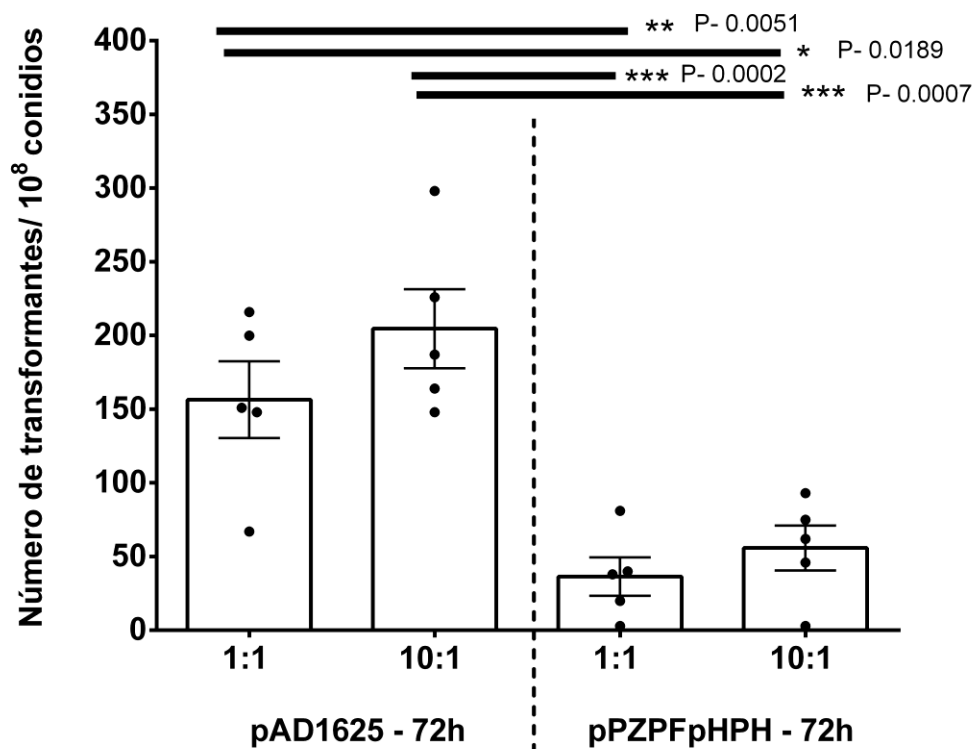


Figura 26: Número médio de transformantes de *F. pedrosoi* obtidos por transformação via *Agrobacterium*. Comparação da eficiência de transformação por *Agrobacterium* utilizando dois plasmídeos o pAD1625 e pPZPFpHPH. A figura mostra as condições testadas para transformação, proporção de bactéria: fungo após 72h de co-cultivo. A linha pontilhada separa os grupos por plasmídeo. As barras representam o erro padrão de cada grupo. Teste estatístico aplicado: One-Way ANOVA, post-teste: Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas. Entre as condições testadas (proporção bactéria: fungo não houve diferença estatística), sendo n=5 para cada plasmídeo utilizado.

**Tabela 6: Número de transformantes de *F. pedrosoi* obtidos após ATMT por 10<sup>8</sup> células após 72h de co-cultivo**

Parâmetro: taxa de co-cultivo (bactéria:fungo)	pAD 1625		pPZPhpFp	
	Número mínimo e máximo	Média (± 50)	Número mínimo e máximo	Média (± 50)
1:1	67-200	141	3-81	35
10:1	148-298	209	3-93	54

Nos experimentos seguintes os tempos de co-cultivo de 48 e 72 horas foram avaliados, no entanto, com menor número de conídios alvo por placa (10<sup>6</sup>). Segundo a

figura 27 os dados mostram que o tempo de 48 horas com a proporção de 1:1 não possui uma boa eficiência para gerar células transformantes, ao contrário da incubação por 72 horas nas proporções de 10:1 e 100:1, que foi onde se obteve um maior número de transformantes (tabela 7). Assim sendo, pode-se concluir que quanto maior o tempo de co-cultivo, e com uma proporção em que o número de *Agrobacterium* seja maior que o de células a serem transformadas é a melhor condição para se gerar transformantes de *F. pedrosoi*.

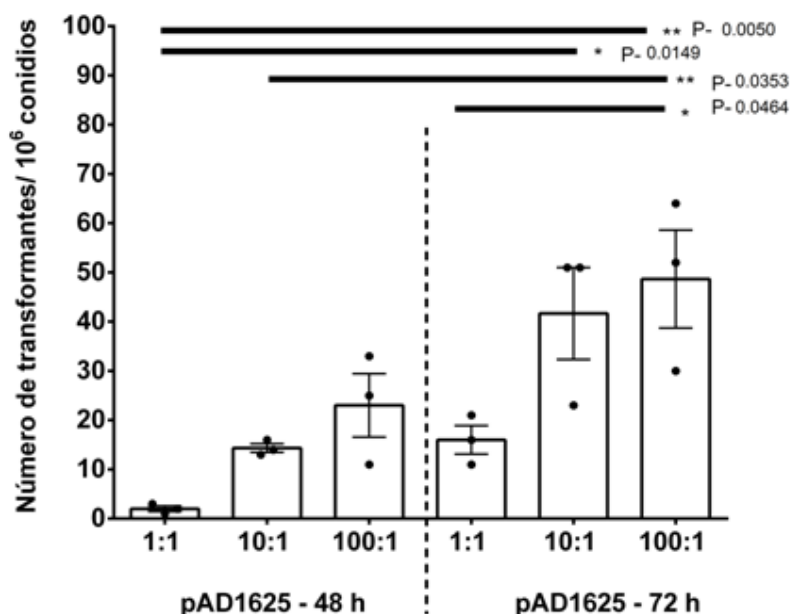


Figura 27: Número de transformantes de *Agrobacterium* obtidos com plasmídeo pAD1625 em função dos tempos de co-cultivo 48 e 72h. A linha pontilhada separa os grupos em função do tempo avaliado. As barras representam o erro padrão de cada grupo. Teste estatístico aplicado: Two-way ANOVA, pos-teste: Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre a proporção de 1:1 em 48 h e 10:1/100:1 em 72 h, 10:1 em 48 h e 100:1 em 72 h e 1:1 em 72 h e 100:1 em 72 h. Foram feitos três experimentos independentes.

**Tabela 7: Número de transformantes de *F. pedrosoi* obtidos via *Agrobacterium* por 10<sup>6</sup> células em função dos parâmetros avaliados**

Parâmetros: Taxa (Bactéria: Fungo) / tempo de co-cultivo	pAD1625	
	Número mínimo e máximo	Média
<b>1:1/ 48 h</b>	1-3	1
<b>10:1/ 48 h</b>	13-16	9
<b>100:1/ 48 h</b>	11-82	42
<b>1:1/ 72 h</b>	11-21	10
<b>10:1/ 72h</b>	23-51	41
<b>100:1/ 72 h</b>	30-64	48



Trabalhos como o de Zhang *et al.*, (2014) relatam que a eficiência da transformação está correlacionada com o número inicial de conídios para o co-cultivo. Estes autores mostram que o aumento de células alvo do fungo *Penicillium expansum* de  $10^4$  para a  $10^6$  gerou maior número de colônias transformantes, assim como observamos para *F. pedrosoi*, (Tabelas 6 e 7) em que a utilização de  $10^8$  conídios teve uma eficiência 6 vezes maior do que quando utilizado  $10^6$ .

Abuodeh *et al.*, (2000), avaliaram em seu trabalho com *Coccidioides immitis* a utilização de conídios germinados como alvos para *Agrobacterium*, e observou uma boa eficiência em comparação ao uso de conídios não germinados, além disto, estes autores relataram melhora da eficiência quando a proporção de *Agrobacterium*: conídios fúngicos foi aumentada. No presente trabalho, não foram utilizados conídios germinados de *F. pedrosoi*, o que poderá ser testado no futuro a fim de se avaliar se há algum efeito no número de transformantes. Covert *et al.*, (2001) em seu trabalho testaram  $10^4$  e  $10^5$  esporos de para transformação por *Agrobacterium*, porém não foi observada relação direta entre número de esporos iniciais e a eficiência da transformação de *Fusarium circinatum*.

O teste de estabilidade mitótica (Figura 28) foi utilizado para avaliar quão estáveis são os transformantes de *F. pedrosoi* obtidos via *Agrobacterium*, e observou-se 100% de estabilidade. Fang *et al.*, (2006), relataram que 95% dos transformantes de *Beauveria bassiana* eram estáveis após cinco passagens em meio não seletivo. A maioria dos trabalhos utilizando *Agrobacterium*, como o de Rho *et al.*, (2001) que transformaram *M. grisea*; Figueiredo *et al.*, (2010) que transformaram *G. citricarpa* e Duarte *et al.*, (2007) que transformaram *M. anisopliae*, relatam que os transformantes apresentam alta estabilidade.

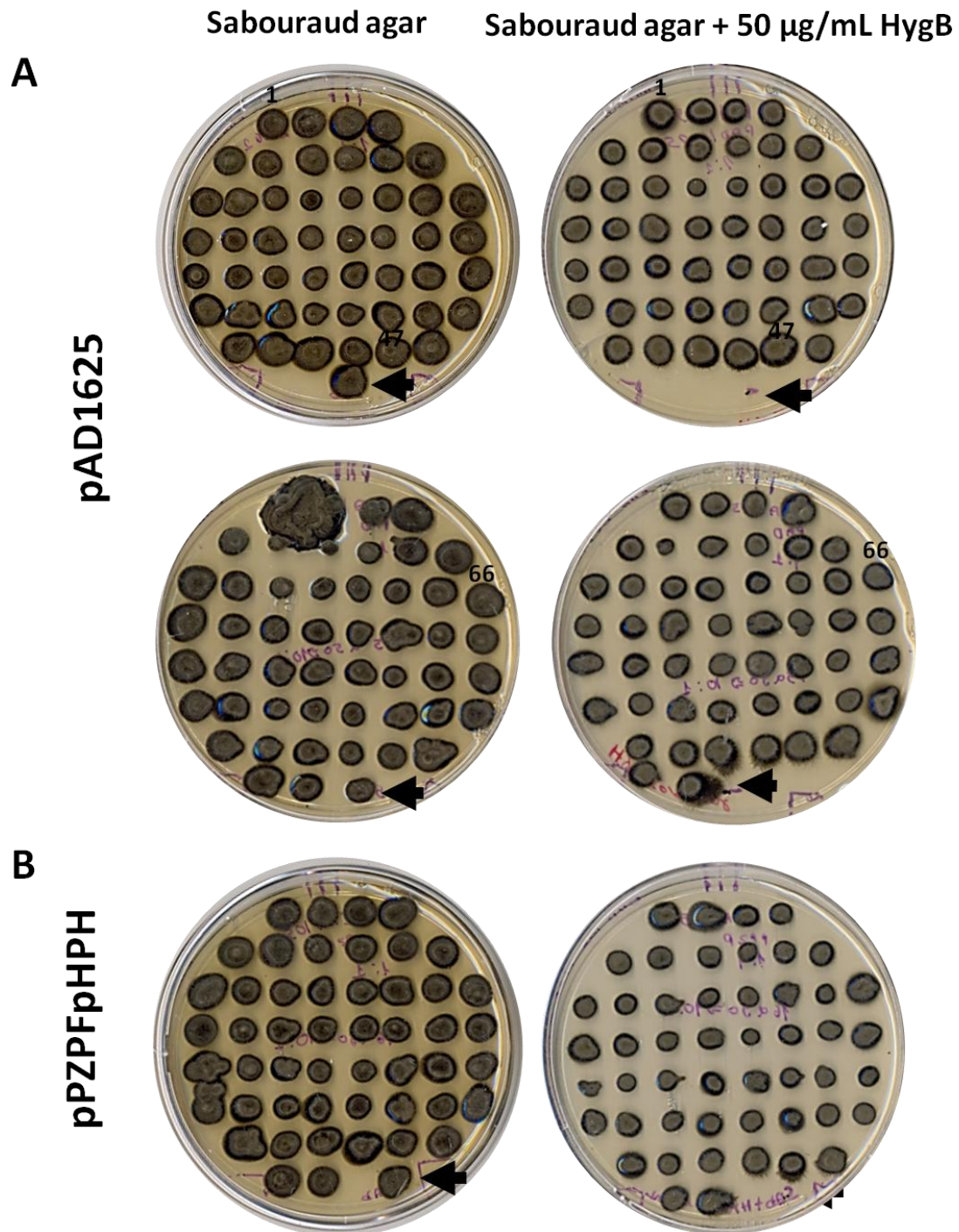


Figura 28: Mutantes de *F. pedrosoi* transformados por *Agrobacterium* com plasmídeo pPZPFpHPH e pAD1625 após a terceira passagem no meio seletivo e não seletivo. Os transformantes foram repicados três vezes consecutivas em meio Sabouraud agar com e sem Higromicina B (50 µg/ML), incubados a 25 °C por 10 dias para checar a estabilidade mitótica. A seta indica o controle CBS 271.37 não transformado. Os números 1, 18, 47 e 66 indicam os transformantes que tiveram o DNA genômico extraído para confirmação da integração do gene *hph*.

A transformação do fungo *F. pedrosoi* via *Agrobacterium* proporcionou o crescimento de colônias mutantes estáveis em placas de Sabouraud ágar contendo o

antibiótico Higromicina B, destas, três obtidas pela inserção de cada plasmídeo (pAD1625: 1, 47 e 66; e pZPFpHPH: 1, 18 e 47) foram coletadas e repicadas em meio líquido para extração de DNA genômico para confirmação da presença do gene *hph* no genoma. A figura 29 apresenta o resultado da PCR que mostra que todos os seis transformantes estáveis analisados apresentam o fragmento de 1 kb referente à amplificação da ORF *hph* usando os oligonucleotídeos Fp 1 e Fp 2. Para estimar o número de integrações no genoma foi feito o Southern blot com sonda para o gene *hph*.

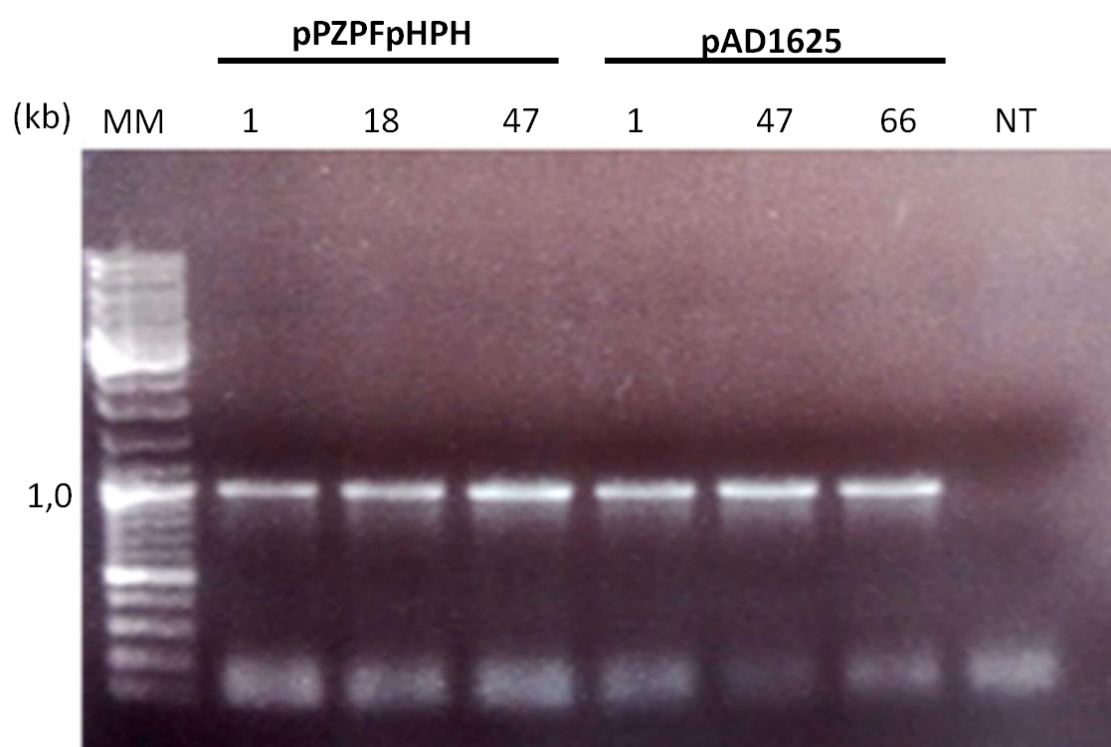


Figura 29: Confirmação da presença do gene de resistência à Higromicina B nos transformantes de *F. pedrosoi* obtidos por *Agrobacterium* com pAD1625 e pZPFpHPH. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da PCR de confirmação dos transformantes hygR. Os números correspondem aos transformantes escolhidos para extração de DNA genômico. NT corresponde ao controle negativo CBS 271.37 não transformado que não apresentou amplificação. MM: Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo).

Embora nos últimos anos as técnicas de transformação genética por biobalística e mediada por *Agrobacterium* já tenham provado ser poderosas ferramentas de manipulação genética para várias espécies de fungos, até então permanecia desconhecido se ambas as técnicas poderiam ser aplicadas para *F. pedrosoi*. Neste estudo foi descrito que *Agrobacterium* e biobalística são técnicas confiáveis e

promissoras para a transformação de *F. pedrosoi*, sendo a primeira vez que o principal fungo demáceo causador de cromoblastomicose foi manipulado geneticamente.

Os conídios de *F. pedrosoi* foram transformados utilizando as marcas de seleção que conferem resistência à Higromicina B, Nourseotricina e Neomicina, os transformantes obtidos adquiriram resistência às drogas e permaneceram estáveis após várias passagens em meios não seletivos.

O método de biobalística destaca-se pela possibilidade de usar não só o DNA genômico como plasmidial (Lorito *et al.*, 1993; Aragão *et al.*, 2009) ou fragmentos de DNA para transformação nas células alvo. Os resultados deste trabalho demonstraram que a utilização de biobalística para a transformação genética de *F. pedrosoi* através de conídios é eficaz, bem como *Agrobacterium*. O bombardeamento de partículas é um método mais rápido em comparação com *Agrobacterium*, que apesar da utilização de um protocolo mais longo tem uma eficácia melhor do que biobalística para produzir transformantes estáveis. Além disto, a biobalística possui outra desvantagem em relação à *Agrobacterium*, por ser uma técnica que requer equipamentos e insumos específicos.

Com relação à técnica mediada por *Agrobacterium*, dos plasmídeos carregados pela cepa EHA105, o pAD1625 gerou mais transformantes do que o pZPFpHPH, e comparando as proporções de co-cultivo, para ambos os plasmídeos, a de 10:1 (bactéria:fungo) e tempo de co-cultivo de 72 horas foi a condição em que se obteve a melhor eficiência. Os tempos de co-cultivo de 48 e 72 h foram analisados com a cepa EHA105 contendo o plasmídeo pAD1625 e  $10^6$  conídios como células alvo. Nestes experimentos o tempo de 72 horas de co-cultivo gera um maior número de transformantes do que 48 horas, o que corrobora com dados relatados em outros trabalhos como o de Abello *et al.*, (2008), em que o tempo de co-cultivo está ligado diretamente com a eficiência da transformação. Outros fatores descritos por outros autores que podem afetar a eficiência de transformação como diferentes temperaturas de co-cultivo, uso de conídios germinados ou protoplastos, variação na concentração de acetoseringona e uso de outras cepas de *Agrobacterium* não foram avaliados neste trabalho e poderão ser explorados no futuro para aumento da eficiência de transformação.

### 5.7. Estimativa do número de integrações por Southern Blot

Após a confirmação por PCR da inserção de *hph* no genoma dos transformantes resistentes a Higromicina B, obtidos por ambas as técnicas de transformação genética, estes foram submetidos ao Southern blot (figura 30) para estimar o número de cópias integradas ao genoma. Foi utilizado um fragmento de 0,6 kb relativo ao gene *hph* como sonda e a enzima *BglII* para digestão do DNA genômico por não apresentar nenhum sítio no gene *hph*, e por esta enzima cortar uma única vez cada plasmídeo ou T-DNA usado neste trabalho. Como mostra a figura 30A os transformantes obtidos por biobalística pelo uso do plasmídeo pFpHYG contendo sequências próprias de *F. pedrosoi* controlando o gene *hph*, todos os quatro mutantes apresentaram integrações múltiplas com diferentes padrões no genoma, para o plasmídeo pAN7.1 (que apresenta sequências promotora e terminadora heteróloga de *Aspergillus*) 3 transformantes dos 4 analisados apresentaram múltiplas integrações do gene *hph*. Os resultados mostram que as bandas de hibridação foram detectadas em todos os transformantes analisados, enquanto nenhum sinal foi visualizado na cepa selvagem CBS271.37. Os controles positivos pAN7.1, pFpHYG e pZPFpHPH linearizados com *BglII* apresentaram uma banda única de 6,8 kb, 5,4 kb e 9.2 kb, respectivamente. Estes resultados sugerem que o uso de sequências próprias de *F. pedrosoi* parece favorecer inserções múltiplas no genoma, possivelmente nas regiões de homologia às sequências usadas para construção do plasmídeo (promotor *gapdh* e terminador *trpC*), no entanto os locais onde ocorreram as integrações não foram avaliados. É interessante observar que uma inserção de 6 kb foi detectada em todos os transformantes por biobalística analisados, o que pode indicar uma integração plasmidial completa em um sítio específico do genoma favorecido pelas sequências homólogas de *F. pedrosoi* que conduzem a expressão de *hph*. Os transformantes obtidos por *Agrobacterium* contendo pAD1625 receberam apenas uma única cópia do T-DNA, os três transformantes avaliados apresentaram fragmentos acima de 4,8 kb (Fig. 30B). Diferentemente, observamos que dois dos três mutantes obtidos usando pZPFpHPH têm duas inserções do DNA-T (Fig. 30B) com hibridações de ~ 4,5 e 6 kb (o T-DNA de pZPFpHPH corresponde a 3 kb), enquanto apenas um mutante tinha integração única do T-DNA. Esses resultados confirmaram que os genes exógenos foram integrados com sucesso no genoma de *F. pedrosoi* e ambos os métodos geraram eficientemente transformantes estáveis.

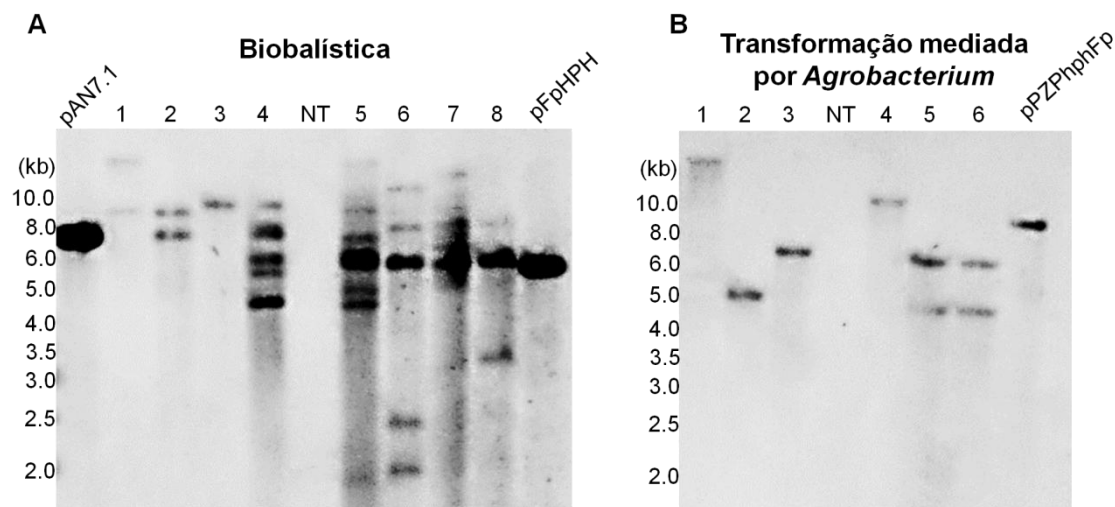


Figura 30: Estimativa do número de cópias do gene *hph* no genoma dos transformantes de *F. pedrosoi* por Southern blot. Dez microgramas de DNA genômico foram digeridos com *Bgl*III, e a sonda marcada com digoxigenina utilizada corresponde a 0,6 kb do gene *hph*. **(A)** Transformantes obtidos por biobalística, 1-4 pAN7.1 e 5-8 pFpHYG. **(B)** Transformantes obtidos via *Agrobacterium*, 1-3 pAD1625 e 4-6 pPZPFpHPH. A cepa de *F. pedrosoi* CBS 271.37 foi usada como controle negativo não transformado (NT), enquanto os plasmídeos pAN7.1, pFpHYG e pPZPFpHPH foram linearizados com *Bgl*III e usados como controle positivo. O marcador molecular está indicado no lado esquerdo de cada figura.

Em relação ao número de integrações genômicas de T-DNA em *F. pedrosoi* após transformação via *Agrobacterium*, foi observado que os transformantes obtidos por pAD1625 tiveram inserções únicas, enquanto que aqueles que possuíam o T-DNA controlado por sequências homólogas de *F. pedrosoi* apresentavam um ou dois fragmentos hibridizados. Meyer *et al.*, (2003), também testaram várias técnicas de transformação para *A. giganteus*, entre elas biobalística e *Agrobacterium*, e assim como neste trabalho estes autores verificaram que os transformantes obtidos por *Agrobacterium* apresentam somente uma inserção do gene de resistência no genoma. Outros trabalhos relatam inserções únicas no genoma por esta técnica, como por exemplo, em *F. oxysporum*, *A. awamori*, *Calonectria morganii* e *Suillus bovinos* (de Groot *et al.*, 1998, Malonek e Meinhardt 2001, Mullins *et al.*, 2001). Em contraste, a transformação por biobalística de *F. pedrosoi* resultou em eventos de integração variados, a depender do plasmídeo utilizado. Outros trabalhos também relatam variação do número de cópias integradas no genoma dos transformantes obtidos por biobalística em fungos filamentosos. Gonzalez-Hernandez *et al.*, (1997), relatam a integração de 2 a 3 cópias do plasmídeo no genoma dos transformantes de *M. circinelloides*, o mesmo foi

observado por Chaves-Barreto *et al.*, (1997) em *P. fumosoroseus*, bem como Lorito *et al.*, (1993) para *T. harzianum* e *G.virens*. Apesar disto, alguns autores reportaram integrações não homólogas únicas, como Yu & Cole (1998) em *C. immitis* e Hibert *et al.*, (1994) em *B. fuckeliana*. Assim, o método de transformação mediado por *Agrobacterium* parece ser uma abordagem mais promissora para a mutagênese insercional e recombinação homóloga e para a marcação ou a ruptura de genes, em comparação com o bombardamento de partículas recobertas de DNA.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os experimentos demonstram que o uso de biobalística para a transformação genética de *F. pedrosoi* através de conídios é efetivo assim como o uso de *Agrobacterium*. O método de bombardeamento de partículas é mais rápido em comparação com *Agrobacterium* que apesar de levar alguns dias para as manipulações celulares, tem uma eficácia melhor do que a biobalística para produzir transformantes estáveis. Além disso, a biobalística é uma técnica que exige equipamento e consumíveis específicos. Embora ambas as técnicas tenham produzido transformantes estáveis, no caso da biobalística não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados, porém foi possível observar que a utilização da distância de seis centímetros entre as partículas e as células alvo, com o tempo de incubação em meio não seletivo de vinte e quatro horas para recuperação das células proporcionou um maior número de transformantes.

Em relação à transformação mediada por *Agrobacterium* foi visto que a utilização do plasmídeo pAD1625 apresentou maior número de transformantes do que o plasmídeo pPZPFpHPH, apesar deste último ter sido construído com promotor e terminador próprio de *Fonsecaea*. Para o plasmídeo pAD1625 foi possível observar que a utilização de uma maior proporção de células de *Agrobacterium* em contato com os esporos (proporções de 10:1 e 100:1) e um tempo de incubação de 72 horas de co-cultivo são as melhores condições para se obter maior número de transformantes.

Este é o primeiro estudo em que uma cepa de *Fonsecaea* foi geneticamente transformada, esses resultados abrem novos caminhos para melhor compreender a patobiologia do fungo para futuras abordagens genéticas de perda e ganho de função. Como perspectivas deste trabalho pretende-se construir cassetes de deleção para genes envolvidos na biologia e virulência de *Fonsecaea*, além de utilizar técnicas de edição genômica como CRISPR-Cas9.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abello J, Kelemu S, García C. *Agrobacterium*-mediated transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* associated with *Brachiaria* grasses. *Mycological research*. 2008;112(3):407-13.
- Aboul-Soud MA, Yun B-W, Harrier LA, Loake GJ. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. *Mycopathologia*. 2004;158(4):475-82.
- Abuodeh RO, Orbach MJ, Mandel MA, Das A, Galgiani JN. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181(6):2106-10.
- Al-Hedaithy S, Jamjoom Z, Saeed E. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Saudi Arabia. *APMIS Suppl*. 1988;3:94-100.
- Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, Holandino C, Rozental S, Ejzemberg R, Alviano SC, Rodrigues ML. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infection and Immunity*. 2004 Jan;72(1):229-37.
- Ameen M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2009;34(8):849-54.
- Ando A, Sumida Y, Negoro H, Suroto DA, Ogawa J, Sakuradani E, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(17):5529-35.
- Aragão FJ, Brasileiro A. Introdução de genes em células vegetais mediada pelo processo biobalístico. *Cultura in Vitro de Plantas* (L Barreto, Ed) Embrapa, Brasília. 2009.
- Armaleo D, Ye GN, Klein TM, Shark KB, Sanford JC, Johnston SA. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*. 1990;17(2):97-103.
- Auyong ASM, Ford R, Taylor PWJ. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. *Journal of Basic Microbiology*. 2012;52(4):372-82.

- Bailey AM, Mena GL, Herrera-Estrella L. Transformation of four pathogenic *Phytophthora* spp by microprojectile fungus *Coccidioides immitis* bombardment of intact mycelia. *Current Genetics*. 1993; 23(1):42–46.
- Bills SN, Richter DL, Podila GK. Genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by particle bombardment. *Mycological Research*. 1995;99(5):557-61.
- Bocca AL, Brito PP, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*. 2006;161(4):195-203.
- Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. Chromoblastomycosis: Clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*. 2001;44(1-2):1-7.
- Brandt M, Warnock D. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *Journal of Chemotherapy*. 2003;15(sup2):36-47.
- Brasileiro ACM, Carneiro VC. Manual de transformação genética de plantas. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. 1998.
- Bravo J, Evans D. Protoplast fusion for crop improvement. *Plant Breeding Reviews*, Volume 3. 2011:193-218.
- Bretz C, Gersuk G, Knoblauch S, Chaudhary N, Randolph-Habecker J, Hackman RC, et al. MyD88 signaling contributes to early pulmonary responses to *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*. 2008;76(3):952-8.
- Cardona-Castro N, Agudelo-FLÓrez P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Medical Mycology*. 1999;37(2):81-3.
- Carrión AL. Chromoblastomycosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1950;50(1):1255-82.
- Case ME, Schweizer M, Kushner SR, Giles NH. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979;76(10):5259-63.
- Chaves Barreto C, Cardoso Alves L, Lima Aragão FJ, Rech E, Schrank A, Henning Vainstein M. High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *FEMS microbiology letters*. 1997;156(1):95-9.

- Chen L, Wang Q, Chen H, Sun G, Liu H, Wang H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Botryosphaeria dothidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016;32(7):1-5.
- Chira S, Jackson CS, Oprea I, Ozturk F, Pepper MS, Diaconu I, Braicu C, Raduly, L-Z, Calin GA, Neagoe IB. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget*. 2015;6(31):30675.
- Correia RT, Valente NY, Criado PR, Martins JE. Chromoblastomycosis: study of 27 cases and review of medical literature. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2010 Jul-Aug;85(4):448-54.
- Covert SF, Kapoor P, Lee M-h, Briley A, Nairn CJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research*. 2001;105(3):259-64.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in biochemical sciences*. 1995;20(11):448-55.
- Cunha MM, Franzen AJ, Seabra SH, Herbst MH, Vugman NV, Borba LP, *et al*. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiology*. 2010;10:80.
- da Silva JP, Alviano DS, Alviano CS, de Souza W, Travassos LR, Diniz JA, *et al*. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2002;33(1):63-9.
- Da Silva MB, Da Silva JP, Yamano SSP, Salgado UI, Diniz JAP, Salgado CG. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(11):3839-41.
- De Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature biotechnology*. 1998;16(9):839-42.
- Degefu Y, Hanif M. *Agrobacterium-tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. *Archives of Microbiology*. 2003;180(4):279-84.

- dos Reis MCI, Fungaro MHP, Duarte RTD, Furlaneto L, Furlaneto MC. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of microbiological methods*. 2004;58(2):197-202.
- Duarte RTD, Staats CC, Fungaro MHP, Schrank A, Vainsten M, Furlaneto-Maia L, *et al.* Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Letters in applied microbiology*. 2007;44(3):248-54.
- Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;93(3):931-40.
- Eisenman HC, Nosanchuk JD, Webber JBW, Emerson RJ, Comesano TA, Casadevall A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry*. 2005;44(10):3683-93.
- Esterre P, Peyrol S, Sainte-Marie D, Pradinaud R, Grimaud J. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Virchows Archiv*. 1993;422(4):285-91.
- Fang W, Zhang Y, Yang X, Zheng X, Duan H, Li Y, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *Journal of invertebrate Pathology*. 2004;85(1):18-24.
- Feng B, Wang X, Hauser M, Kaufmann S, Jentsch S, Haase G, *et al.* Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infection and immunity*. 2001 Mar;69(3):1781-94.
- Figueiredo J, Goulin E, Tanaka F, Stringari D, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa L, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. *Journal of Microbiological Methods*. 2010;80(2):143-7.
- Figueiredo NV. Utilização de métodos de bioimagem para a análise *ex vivo* da infecção causada por *Cryptococcus gattii*. 2013.
- Finer J, Cheng T, Verma D. Soybean transformation: technologies and progress. *Soybean: Genetics, molecular biology and biotechnology*. 1996.
- Flowers JL, Vaillancourt LJ. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. *Current Genetics*. 2005;48(6):380-8.

- Franzen AJ, Cunha MM, Batista EJ, Seabra SH, De Souza W, Rozental S. Effects of tricyclazole (5-methyl-1, 2, 4-triazol [3, 4] benzothiazole), a specific DHN–melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. *Microscopy research and Technique*. 2006;69(9):729-37.
- Franzen AJ, Cunha MM, Miranda K, Hentschel J, Plattner H, da Silva MB, *et al.* Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Journal of Structural Biology*. 2008 Apr;162(1):75-84
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(17):5824-8.
- Fungaro MHP, Rech E, Muhlen GS, Vainstein MH, Pascon RC, de Queiroz MV, *et al.* Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;125(2-3):293-7.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(1):122-43.
- Gimenes VMF, de Souza MDG, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Santos DVdCL, Silva CMP, Almeida SR. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and infection*. 2005;7(4):708-13.
- Gonzalez A, Jimenez A, Vazquez D, Davies J, Schindler D. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1978;521(2):459-69.
- Gritz L and Davies J. Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25 1983.179-188.
- Gupta A, Ryder J, Johnson A. Cumulative meta-analysis of systemic antifungal agents for the treatment of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*. 2004;150(3):537-44.
- Gupta A, Taborda P, Sanzovo A. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Medical Mycology*. 2002;40(5):529-34.

- Hakkila K, Maksimow M, Karp M, Virta M. Reporter genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Analytical Biochemistry*. 2002;301(2):235-42.
- Hamada W, Reignault P, Bompeix G, Boccara M. Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, hph. *Current Genetics*. 1994;26(3):251-5.
- Hanif M, Pardo A, Gorfer M, Raudaskoski M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics*. 2002;41(3):183-8
- Hansen G, Das A, Chilton M-D. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(16):7603-7.
- Hazell BW, Te'o VSJ, Bradner JR, Berquist PL, Nevalainen KMH. Rapid transformation of high secreting mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Letters in applied microbiology*. 2000; 30 (4), 282–286.
- He L, Feng J, Lu S, Chen Z, Chen C, He Y, et al. Genetic transformation of fungi. *The International Journal of Developmental Biology*. 2017;61(6-7):375-81.
- Herzog RW, Daniell H, Singh NK, Lemke PA. A comparative study on transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment of conidia and a more conventional procedure using protoplasts treated with polyethylene glycol (PEG). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996; 45 (3), 333–337.
- Hilber U, Bodmer M, Smith F, Köller W. Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. *Current genetics*. 1994;25(2):124-7.
- Holsters M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG*. 1978;163(2):181-7.
- Hu Y, Dai Q, Liu Y, Yang Z, Song N, Gao X, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the causative agent of Valsa canker of Apple Tree *Valsa mali* var. *mali*. *Current microbiology*. 2014;68(6):769-76.
- Hunt GA, Fogel R. Fungal hyphal dynamics in a western Oregon Douglas-fir stand. *Soil Biology and Biochemistry*. 1983;15(6):641-9.
- Hynes MJ. Genetic transformation of filamentous fungi. *Journal of Genetics*. 1996;75(3):297-311.

- Inglis P, Aragao F, Frazao H, Magalhaes B, Valadares-Inglis M. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. FEMS Microbiology Letters. 2000;191(2):249-54.
- Islam MN, Nizam S, Verma PK. A highly efficient Agrobacterium mediated transformation system for chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* using DsRed-Express to follow root colonisation. Microbiological Research. 2012;167(6):332-8.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012;337(6096):816-21.
- Kaster KR, Burgett SG, Rao RN, Ingolia TD. Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. Nucleic Acids Research. 1983; 11(19): 6895-6919.
- Kim MS, Kim SY, Yoon JK, Lee YW, Bahn YS. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009 ;390(3):983-8.
- Klein TM, Wolf E, Wu R, Sanford J. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature. 1987;327(6117):70-3.
- Kochupurakkal BS, Iglehart JD. Nourseothricin N-acetyl transferase: a positive selection marker for mammalian cells. PloS one. 2013;8(7):e68509.
- Kogej T, Wheeler MH, Lanišnik Rižner T, Gunde-Cimerman N. Evidence for 1, 8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. FEMS Microbiology Letters. 2004;232(2):203-9.
- Kummasook A, Cooper Jr CR, Vanittanakom N. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation system for the functional genetic analysis of *Penicillium marneffei*. Medical Mycology. 2010;48(8):1066-74.
- Kunitake E, Tani S, Sumitani J-i, Kawaguchi T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus aculeatus* for insertional mutagenesis. AMB Express. 2011;1(1):46.
- Kwon-Chung KJ & Bennett JE. Chromoblastomycosis. Medical Mycology (Cann C & Hunsberger S, eds) 1992; pp. 337–355.

- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2003;38(2):143-58.
- Larone DH. *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.1995.
- Lima I, Duarte R, Furlaneto L, Baroni C, Fungaro M, Furlaneto M. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Letters in Applied Microbiology*. 2006;42(6):631-6.
- Liu N, Chen G-Q, Ning G-A, Shi H-B, Zhang C-L, Lu J-P, Mao L-J, Feng X-X, Liu X-H, Su Z-Z, Lin F-C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: An efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption in *Harpophora oryzae*. *Microbiological Research*. 2016;182:40-8.
- López Martínez R, Méndez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology*. 2007;25(2):188-94.
- Lorito M, Hayes C, Di Pietro A, Harman G. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Current Genetics* 1993; 24(4):349-356.
- Lupi O, Tying SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;53(6):931-51.
- Mach RL, Schindler M, Kubicek CP. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current Genetics*. 1994;25(6):567-70.
- Malonek S, Meinhardt F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. *Current Genetics*. 2001;40(2):152-5.
- Maor R, Puyesky M, Horwitz B, Sharon A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*. 1998;102(04):491-6.
- Matte SM, Lopes JO, Melo IS, Espadim LER, Pinto MS. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997;30(4):309-11.



- McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1983;8(1):1-16.
- Mendoza L, Karuppayil S, Szaniszlo P. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses*. 1993;36(5-6):157-64.
- Meyer V, Mueller D, Strowig T, Stahl U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Current Genetics*. 2003;43(5):371-7.
- Meyer V. Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*. 2008;26(2):177-85.
- Michielse CB, Hooykaas PJ, Van Den Hondel CA, Ram AF. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols*. 2008;3(10):1671.
- Mishra N, Tatum E. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(12):3875-9.
- Moore MM. Genetic engineering of fungal cells. *Biotechnology, Fundamentals in Biotechnology*. 2009;3:36-66.
- Mora-Lugo R, Zimmermann J, Rizk AM, Fernandez-Lahore M. Development of a transformation system for *Aspergillus sojae* based on the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated approach. *BMC Microbiology*. 2014;14(1):247.
- Mostafiz S, Rahman M, Rahman M. Biotechnology: role of microbes in sustainable agriculture and environmental health. *The Internet Journal of Microbiology*. 2012;10(1).
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser D, Kang S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*. 2001;91(2):173-80.
- Najafzadeh M J, Sun J, Vicente VA, Klaassen CH, Bonifaz A, Van den Ende AG, de Hoog GS. Molecular epidemiology of *Fonsecaea* species. *Emerging Infectious Diseases*. 2011; 17(3):464.
- Nakamura M, Kuwahara H, Onoyama K, Iwai H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for investigating pathogenicity genes of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum sansevieriae*. *Current microbiology*. 2012;65(2):176-82.
- Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*. 2003;5(4):203-23.

- Olmedo-Monfil V, Cortés-Penagos C, Herrera-Estrella A. Three decades of fungal transformation: key concepts and applications. *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*. 2004:297-313.
- Palmeira VF, Alviano DS, Braga-Silva LA, Goulart FRV, Granato MQ, Rozental S, Alviano CS, Santos ALS, Kneipp LF. HIV Aspartic Peptidase Inhibitors Modulate Surface Molecules and Enzyme Activities Involved with Physiopathological Events in *Fonsecaea pedrosoi*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(918).
- Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, dos Santos ALS. Phospholipase and esterase production by clinical strains of *Fonsecaea pedrosoi* and their interactions with epithelial cells. *Mycopathologia*. 2010;170(1):31-7.
- Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, Dos Santos ALS. Secretory aspartyl peptidase activity from mycelia of the human fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi*: effect of HIV aspartyl proteolytic inhibitors. *Research in Microbiology*. 2006;157(9):819-26.
- Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, Santos ALSd. The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2005;46(1):21-9.
- Perani L, Radke S, Wilke-Douglas M, Bossert M. Gene transfer methods for crop improvement: introduction of foreign DNA into plants. *Physiologia Plantarum*. 1986;68(3):566-70.
- Poirriez J, Breuillard F, Francois N, Fruit J, Sendid B, Gross S, et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;63(1):61-3.
- Powell PE, Szaniszló PJ, Reid CP. Confirmation of occurrence of hydroxamate siderophores in soil by a novel *Escherichia coli* bioassay. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983;46(5):1080-3.
- Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, Soede RD, Pouwels PH, van den Hondel CA. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*. 1990 Sep 1;93(1):101-9.

- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CA. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*. 1987;56(1):117-24.
- Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DWC, Salgado CG, Vicente VA, Bonifaz A, Roilides E, Xi L, Azevedo CM, da Silva MB, Pana ZD, Colombo AL, Walsh TJ. Chromoblastomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017;30(1):233-76.
- Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*. 2009; 47: 3–15.
- Queiroz-Telles F. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015;57:46-50.
- Rajasekaran K, Cary JW, Cotty PJ, Cleveland TE. Development of a GFP-expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed. *Mycopathologia*. 2008;165(2):89-97.
- Rambosek J, Leach J, Kinsey JA. Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1987;6(4):357-93.
- Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(4):884-928.
- Rho HS, Kang S, Lee YH. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*. 2001 Dec31;12(3):407-11.
- Ribeiro EL, Soares AJ, Ferreira WM, Cardoso CG, Naves PLF, Dias SMdS. Cromoblastomicose: doença presente na realidade populacional brasileira. *RBAC*. 2006;38(3):189-92.
- Rippon JW. Chromoblastomycosis. *Medical Mycology (Sauders WB, ed) 1998*; pp. 276–296.
- Rivera AL, Magana-Ortiz D, Gomez-Lim M, Fernández F, Loske AM. Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*. 2014;11(2):184-203.
- Rolland S, Jobic C, Fèvre M, Bruel C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid

- conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Current Genetics*. 2003;44(3):164-71.
- Rozental S, Alviano C, De Souza W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1996;34(5):323-30.
- Saberi H, Kashfi A, Hamidi S, Tabatabai SAF, Mansouri P. Cerebral phaeohyphomycosis masquerading as a parafalcian mass: case report. *Surgical Neurology*. 2003;60(4):354-9.
- Salgado CG, Silva JPd, Diniz JAP, Silva MBd, Costa PFd, Teixeira C, Salgado UI. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2004;46(1):33-6.
- Sambrook K.J, Fritsch E.F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. Press, N.Y.
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*. 1987;5(1):27-37.
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*. 1993;217:483-509.
- Santarém E. Efficient methods for genetic plants transformation. *R Ciencia Tecnologia* 2000;15:81-90.
- Santos ALS, Palmeira VF, Rozental S, Kneipp LF, Nimrichter L, Alviano DS, Rodrigues ML, Alviano CS. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007; 31(5):570-91.
- Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N, Zündorf J, Lütticken R, Haase G. Effect of Melanin and Carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on Phagocytosis, Oxidative Burst, and Killing by Human Neutrophils. *Infection and Immunity*. 1999;67(1):94-101.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 2004;22(12):1567.

- Shao C, Yin Y, Qi Z, Li R, Song Z, Li Y, Wang Z. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Fungal Genetics and Biology*. 2015;83:19-25.
- Shark KB, Smith FD, Harpending PR, Rasmussen JL, Sanford JC. Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57(2):480-5.
- Shimizu T, Ito T, Kanematsu S. Functional analysis of a melanin biosynthetic gene using RNAi-mediated gene silencing in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology*. 2014 Apr;118(4):413-21.
- Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia*. 1998;143(3):171-5.
- Siqueira IM, de Castro RJA, de Miranda Leonhardt LC, Jerônimo MS, Soares AC, Raiol T, Nishibe C, Almeida N, Tavares AH, Hoffmann C, Bocca AL. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(3):e0005461.
- Sivan A, Stasz T, Hemmat M, Hayes C, Harman G. Transformation of *Trichoderma* spp. with plasmids conferring hygromycin B resistance. *Mycologia*. 1992:687-94.
- Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(4):1798-802.
- Sun J, Najafzadeh MJ, Vicente V, Xi L, de Hoog GS. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 80: 19–24.
- Sun J, Zhang J, Najafzadeh M, Badali H, Li X, Xi L, *et al*. Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2011;172(5):373.
- Sun L, Yan M, Ding Z, Liu Y, Du M, Xi P, Liao J, Ji L, Jiang Z. Improved dominant selection markers and co-culturing conditions for efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Ustilago scitaminea*. *Biotechnology Letters*. 2014;36(6):1309-14.

- Sunagawa M, Murata H, Miyazaki Y, Nakamura M. Transformation of the Mycorrhizal Basidiomycetes, *Suillus grevillei* and *S. bovinus*, by Particle Bombardment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(1):47-50
- Te'o V, Bergquist P, Nevalainen K. Biolistic transformation of *Trichoderma reesei* using the Bio-Rad seven barrels Hepta Adaptor system. *Journal of Microbiological Methods*. 2002; 51(3):393-399.
- Thornton CR, Ryder LS, Le Cocq K, Soanes DM. Identifying the emerging human pathogen *Scedosporium prolificans* by using a species-specific monoclonal antibody that binds to the melanin biosynthetic enzyme tetrahydroxynaphthalene reductase. *Environmental Microbiology*. 2015;17(4):1023-38.
- Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 1983;26(2):205-21.
- Toffaletti DL, Rude TH, Johnston SA, Durack D, Perfect J. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *Journal of Bacteriology*. 1993;175(5):1405-11.
- Tokousbalides MC, Sisler H. Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1979;11(1-3):64-73.
- Torres AC, Ferreira AT, Buso J, Caldas L, Nascimento A, Brigido MdM, Romano E. Glossário de biotecnologia vegetal. Embrapa Hortaliças-Livros técnicos (INFOTECA-E). 2000.
- Tzima AK, Paplomatas EJ, Schoina C, Domazakis E, Kang S, Goodwin PH. Successful *Agrobacterium* mediated transformation of *Thielaviopsis basicola* by optimizing multiple conditions. *Fungal Biology*. 2014;118(8):675-82.
- Van Burik J-AH, Magee PT. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual Reviews in Microbiology*. 2001;55(1):743-72.
- Walton FJ, Idnurm A, Heitman J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*. 2005;57(5):1381-96.
- Wang J-y, Li H-y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Journal of Zhejiang University-Science B*. 2008;9(10):823-8.

- Watanabe A, Fujii I, Tsai H, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Ebizuka Y. *Aspergillus fumigatus* alb1 encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*. FEMS Microbiology Letters. 2000 Nov 1;192(1):39-44.
- White D, Chen W. Genetic transformation of *Ascochyta rabiei* using *Agrobacterium*-mediated transformation. Current Genetics. 2006;49(4):272-80.
- White LP. Melanin: a naturally occurring cation exchange material. Nature. 1958;182(4647):1427-8.
- Xi L, Sun J, Lu C, Liu H, Xie Z, Fukushima K, Takizawa K, Najafzadeh MJ, Hoog GS. Molecular diversity of *Fonsecaea* (*Chaetothyriales*) causing chromoblastomycosis in southern China. Medical Mycology. 2009;47(1):27-33.
- Xu J, Li J, Lin L, Liu Q, Sun W, Huang B, Tian C. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*. BMC Biotechnology. 2015;15(1):35.
- Yamada T, Makimura K, Satoh K, Umeda Y, Ishihara Y, Abe S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*: an efficient tool for gene transfer. Medical Mycology. 2009;47(5):485-94.
- Yamano SSP. Análise da interação in vitro entre *Fonsecaea pedrosoi* e macrofagos peritoneais de camundongos C57/BL6 e BALB/c: Universidade Federal do Pará; 2008.
- Yenofsky RL, Fine M, Pellow JW. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1990;87(9):3435-9.
- Yu J, Cole G. Biolistic transformation of the human pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Journal of Microbiological Methods. 1998; 33(2):129-141.
- Zeilinger S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. Current Genetics. 2004;45(1):54-60.
- Zhang P, Liu T-T, Zhou P-P, Li S-T, Yu L-J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2. Current Microbiology. 2011;62(4):1315-20.
- Zhang P, Xu B, Wang Y, Li Y, Qian Z, Tang S, Huan S, Ren S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffei*. Mycological Research. 2008;112(8):943-9.
- Zhang T, Qi Z, Wang Y, Zhang F, Li R, Yu Q, Chen X, Wang H, Xiong X, Tang K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Penicillium expansum* PE-12

- and its application in molecular breeding. *Microbiological Research*. 2013;168(3):130-7.
- Zhang Y, Li G, He D, Yu B, Yokoyama K, Wang L. Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;84(3):418-22.
- Zhong Y, Yu H, Wang X, Lu Y, Wang T. Towards a novel efficient T-DNA-based mutagenesis and screening system using green fluorescent protein as a vital reporter in the industrially important fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular Biology Reports*. 2011;38(6):4145-51.
- Zhong YH, Wang XL, Wang TH, Jiang Q. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007;73(6):1348-54.
- Zhou X, Li G, Xu J-R. Efficient approaches for generating GFP fusion and epitope-tagging constructs in filamentous fungi. *Fungal genomics: Methods and Protocols*. 2011:199-212.
- Zwiers L-H, De Waard MA. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*. 2001;39(5-6):388-93.



## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	MICRES_2017_783
<b>Title</b>	Genetic manipulation of <i>Fonsecaea pedrosoi</i> using particles bombardment and <i>Agrobacterium</i> mediated transformation
<b>Article type</b>	Research Paper

### Abstract

*Fonsecaea pedrosoi*, a melanized fungal pathogen that causes Chromoblastomycosis, a human disease with a worldwide distribution. Biolistic is a widely used technique for direct delivery of genetic material into intact cells by particles bombardment. Another well-established transformation method is *Agrobacterium*-mediated transformation (ATMT), which involves the transfer of a T-DNA from the bacterium to the target cells. In *F. pedrosoi* there are no reports of established protocols for genetic transformation, which require optimization of physical and biological parameters. In this work, intact conidia of *F. pedrosoi* were particle bombarded and subjected to ATMT. In addition, we proposed Hygromycin B, Nourseothricin and Neomycin as dominant selective markers for *F. pedrosoi* and vectors were constructed. We tested two parameters for biolistic: the distance of the particles to the target cells and time of cells recovery in nonselective medium. The biolistic efficiency was 37 transformants/  $\mu\text{g}$  of pFpHYG, and 45 transformants/  $\mu\text{g}$  of pAN7.1. Transformants expressing GFP were successfully obtained by biolistic. A co-culture ratio of 10: 1 (bacterium: conidia) and co-incubation time of 72 hours yielded the largest number of transformants after ATMT. Southern blot analysis showed the number of foreign DNA insertion into the genome is dependent upon the plasmid used to generate the mutants. This work describes for the first time two efficient methods for genetically modify *Fonsecaea* and these results open new avenues to better understand the biology and pathogenicity of the main causal agent of this neglected disease.

**Keywords** *Fonsecaea*; genetic transformation; biolistic; *Agrobacterium*-mediated transformation.

**Corresponding Author** Larissa Fernandes Matos

**Corresponding Author's Institution** University of Brasilia

**Order of Authors** Camille Silva Florencio, Fabiana Alves Silva Brandão, Marcus de Mello Teixeira, Anamélia Lorenzetti Bocca, Maria Sueli Soares Felipe, Vania Vicente, Larissa Fernandes Matos

**Suggested reviewers** Charley Staats, Hector Mora-Montes, Alexandre Bailão

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

cover letter.pdf [Cover Letter]

Florencio CS - manuscript.docx [Manuscript File]

Fig1 jpeg.jpg [Figure]

Fig2 jpeg.jpg [Figure]

Fig3 jpeg.jpg [Figure]

Fig4 jpeg.jpg [Figure]

Fig5 jpeg.jpg [Figure]

Fig6 jpeg.jpg [Figure]

Florencio CS - supplementary material.docx [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

## **Research Data Related to this Submission**

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:  
Data will be made available on request

Brasilia, Sept 14<sup>th</sup>, 2017.

Microbiological Research  
Editorial Office

Dear Dr. Jürgen Wendland,

I am submitting the manuscript **“Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium* mediated transformation”** by Camille Silva Florencio, Fabiana Alves Silva Brandão, Marcus de Mello Teixeira, Anamélia Lorenzetti Bocca, Maria Sueli S. Felipe, Vânia Aparecida Vicente, Larissa Fernandes for evaluation and publication in the Microbiological Research.

For two decades our group has been interested on the study of the human fungal pathogens, particularly trying to understand the fungal molecular biology and its implication on pathogenicity mechanisms. Recently, our group sequenced the genome of *Fonsecaea pedrosoi* and *Fonsecaea monophora*, two main agents of the Chromoblastomycosis (CBM), an endemic and neglected human subcutaneous disease. The functional genetic studies are limited for that pathogen since there are no reports of molecular tools for the genetic manipulation of the main etiological agents of CBM. This work describes and compares two genetic feasible and efficient transformation system for *F. pedrosoi*: the mediated by *Agrobacterium* and particle bombardment. We also report the construction of plasmids containing three dominant selective markers that can be used for different Ascomycetes. We optimized molecular tools for the genetic transformation of *F. pedrosoi* opening new ways for future genetic approaches to better understand of its pathobiology. Those methods and tools may also be exploit for the other causative agents of CBM and contribute to the development of future strategies for management of the disease.

I look forward to hearing from you.

Yours sincerely,  
Dr.Larissa Fernandes Matos  
University of Brasilia - Brazil  
[larissaf@unb.br](mailto:larissaf@unb.br); [lfernandesmatos@gmail.com](mailto:lfernandesmatos@gmail.com)

1 **Title:** Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium*  
2 mediated transformation

3 **Authors:** Camille Silva Florencio<sup>a,b</sup>, Fabiana Alves Silva Brandão<sup>b</sup>, Marcus de Mello Teixeira<sup>c</sup>, ,  
4 Anamélia Lorenzetti Bocca<sup>b</sup>, Maria Sueli S. Felipe<sup>d</sup>, Vânia Aparecida Vicente<sup>e,#</sup>, Larissa  
5 Fernandes<sup>a,b,e,#,\*</sup>.

6 <sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde, Faculdade de Ceilândia,  
7 Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

8 <sup>b</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia  
9 Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

10 <sup>c</sup> Pathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, AZ, USA.

11 <sup>d</sup> Universidade Católica de Brasília, Brasília – DF, Brazil <sup>e</sup>

12 <sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Ciências  
13 Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

14 **\*Corresponding author:** Larissa Fernandes, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília,  
15 Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília – DF, Brazil, 72220-275, Phone: +55-61-  
16 31078418; E-mail: [larissaf@unb.br](mailto:larissaf@unb.br); [lfernandesmatos@gmail.com](mailto:lfernandesmatos@gmail.com)

17 <sup>#</sup> Those authors share the Senior authorship

18 E-mail addresses:

19 Camille Silva Florencio - [camille.florencio@yahoo.com.br](mailto:camille.florencio@yahoo.com.br)

20 Fabiana Alves Silva Brandão – [fabianabrandao.as@gmail.com](mailto:fabianabrandao.as@gmail.com)

21 Marcus de Mello Teixeira - [marcus.teixeira@gmail.com](mailto:marcus.teixeira@gmail.com)

22 Anamélia Lorenzetti Bocca - [anamelia.bocca@gmail.com](mailto:anamelia.bocca@gmail.com)

23 Maria Sueli S. Felipe - [msueliunb@gmail.com](mailto:msueliunb@gmail.com)

24 Vânia Aparecida Vicente - [vaniava63@gmail.com](mailto:vaniava63@gmail.com)

25  
26  
27  
28

29 **Abstract**

30  
31 *Fonsecaea pedrosoi*, a melanized fungal pathogen that causes Chromoblastomycosis, a human  
32 disease with a worldwide distribution. Biolistic is a widely used technique for direct delivery of  
33 genetic material into intact cells by particles bombardment. Another well-established transformation  
34 method is *Agrobacterium*-mediated transformation (ATMT), which involves the transfer of a T-DNA  
35 from the bacterium to the target cells. In *F. pedrosoi* there are no reports of established protocols for  
36 genetic transformation, which require optimization of physical and biological parameters. In this  
37 work, intact conidia of *F. pedrosoi* were particle bombarded and subjected to ATMT. In addition, we  
38 proposed Hygromycin B, Nourseothricin and Neomycin as dominant selective markers for *F.*  
39 *pedrosoi* and vectors were constructed. We tested two parameters for biolistic: the distance of the  
40 particles to the target cells and time of cells recovery in nonselective medium. The biolistic efficiency  
41 was 37 transformants/  $\mu\text{g}$  of pFpHYG, and 45 transformants/  $\mu\text{g}$  of pAN7.1. Transformants  
42 expressing GFP were successfully obtained by biolistic. A co-culture ratio of 10: 1 (bacterium:  
43 conidia) and co-incubation time of 72 hours yielded the largest number of transformants after ATMT.  
44 Southern blot analysis showed the number of foreign DNA insertion into the genome is dependent  
45 upon the plasmid used to generate the mutants. This work describes for the first time two efficient  
46 methods for genetically modify *Fonsecaea* and these results open new avenues to better understand  
47 the biology and pathogenicity of the main causal agent of this neglected disease.

48

49 **Keywords:** *Fonsecaea*; genetic transformation; biolistic; *Agrobacterium*-mediated transformation.

50

## 51 **Introduction**

52 *Fonsecaea pedrosoi* is one of the causative agents of the human disease chromoblastomycosis  
53 (CBM). This filamentous fungus produces melanin, which forms a thick layer on the cell wall  
54 (Franzen et al., 2008; Cunha et al., 2010). The fungus lifecycle includes distinct morphological stages,  
55 comprising the conidia, mycelium (infective forms) and sclerotic cells (parasitic form, also called  
56 muriform cells). *F. pedrosoi* is commonly found in tropical and subtropical areas, inhabiting plants  
57 (thorns of tropical plant *Mimosa pudica* or Babassu coconut shell) and decomposing organic materials  
58 (Marques et al., 2006; Salgado et al., 2004; Vicente et al., 2008; Vicente et al., 2013).

59 Chromoblastomycosis is a chronic, granulomatous and suppurative mycosis, affecting the  
60 subcutaneous tissue characterized by the appearance of varied morphology lesions as verrucous  
61 nodules, cauliflower like tumors or psoriasis like plaques (Queiroz-Telles et al., 2017a). The infection  
62 often occurs in the lower limbs when there is traumatic implementation of conidia or fragments of  
63 hyphae in the skin. *F. pedrosoi* is the main etiological agent, but the disease has others causative  
64 agents belonging to *Chaetothyriales* order (Ascomycota, *Erotiomycetes*), including *Phialophora*,  
65 *Cladophialophora*, *Exophiala* and the *Rhinocladiella* genus (Arango et al., 1998; de Azevedo et al.,  
66 2015; Najafzadeh et al., 2010; Naka et al., 1988; Seyedmousavi et al., 2014; Silva et al. 1998; Surash  
67 et al., 2005). CBM is an endemic neglected disease, which affects millions of individuals worldwide  
68 especially in Latin America, Asia and Africa. High incidence in rural workers not adequately  
69 protected during agricultural and extractivism practices, makes it as an occupational disease (Menezes  
70 et al., 2008; Queiroz Tellez et al., 2017a; Queiroz Tellez et al., 2017b; Silva et al., 1995).

71 Genetic transformation is the process of controlled introduction of exogenous nucleic acids  
72 on a genome, without compromising the viability of the cells. There are several methods of gene  
73 transfer and the most common are: chemically mediated DNA transformation, electroporation and  
74 particle bombardment (He et al., 2017; Meyer, 2008; Olmedo-Monfil et al., 2004; Rivera et al., 2014).  
75 The biolistic or particle bombardment is a method that consists in the acceleration of gold or tungsten  
76 micro particles coated with exogenous DNA and directed by vacuum to cross the cell wall and  
77 membrane in a non-lethal way in different types of cells and tissues (Meyer, 2008; Rivera et al.,  
78 2014). A great advantage of this method is that it does not require pretreatment of cells and removal  
79 of the cell wall; however, it requires specific equipment and high cost supplies, besides the fact that  
80 it usually promotes the insertion of multiple copies of exogenous DNA in the genome of the target  
81 cell (Meyer, 2008; Rivera et al., 2014). Biolistic was firstly described for fungal genetic manipulation  
82 by Armaleo et al. (1990) and has been applied for a variety of species from yeasts to molds (reviewed  
83 in Rivera et al., 2014). Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) has  
84 been employed to a wide number organisms including plant and mammalian cells (for review see

85 Matveeva et al., 2014; Kunik et al., 2001). *Agrobacterium* is a gram-negative soil bacterium that  
86 transfers a DNA (T-DNA) located in the Tumor inducing Ti-plasmid, in response to plant phenolic  
87 compounds to random sites into the genome of the target cells (Zambryski, 1988). This method has  
88 been described for several fungal species over at last two decades as an efficient and powerful tool  
89 for genetic manipulation (Abuodeh et al., 2000, Bundock et al., 1995, De Groot et al. 1998, for review  
90 Frandsen, 2011), since it requires no special equipment or cell enzymatic treatments. Despite these  
91 two techniques have been extensive successfully used for fungal research providing new insights into  
92 biology and pathogenesis, they have limitations and advantages to be considered in order to optimize  
93 the parameters that affect the genetic transformation efficiency of different fungi.

94 The biology, virulence factors and molecular mechanisms of pathogenicity of *F. pedrosoi* are  
95 still poorly understood. Although the genomic sequencing of *F. pedrosoi* was recently concluded  
96 (Teixeira et al., 2017), the functional genetic studies are limited in this pathogen since until now, there  
97 has been no report of molecular tools for the genetic manipulation of the main etiological agents of  
98 chromoblastomycosis. This work describes and compares two genetic transformation system for *F.*  
99 *pedrosoi*: the mediated by *Agrobacterium* and particle bombardment, as well as reports the  
100 construction of plasmids containing three dominant selective markers. The optimization of genetic  
101 transformation protocols for *F. pedrosoi* may aid for the understanding of chromoblastomycosis and  
102 their causative agents and contribute to the development of future strategies for management of the  
103 disease.

## 104 **Material and methods**

### 105 **Strains and culture conditions**

106 The *F. pedrosoi* strain CBS 271.37 (ATCC18658) was used for all the experiments and  
107 maintained on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (for 1L: 10 g peptone, 40 g glucose, 15 g agar pH:  
108 5.6 autoclaved at 120 °C / 15 min) at 25 °C for seven days. To obtain the conidia, *F. pedrosoi* was  
109 grown in Potato Dextrose Broth (PDB) (Difco) for seven days at 28 °C under 200 rpm shaking. The  
110 culture was vigorously vortexed for 1 min to release the conidia, filtered through sterile glass wool  
111 assembled in funnels and centrifuged at 3,000 × g for five minutes. Conidia cells were resuspended  
112 in saline (0.9 % NaCl) and counted in Neubauer's chamber to adjust the density. *Escherichia coli*  
113 DH5α and *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 were culture in LB medium.

### 114 **Determination of *F. pedrosoi* susceptibility to the antibiotics used as selective dominant markers**

115 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup> of *F. pedrosoi* conidia were plated in SDA supplemented with Hygromycin B  
116 (Invitrogen) or Nourseotricin (Jena Bioscience) or Neomycin/ G418 (Invitrogen) at three different

117 concentrations 0, 25, 50 and 100 µg/mL. Antibiotic sensitivity was estimated based on mycelial  
118 growth after incubation for up to 30 days at 25°C.

### 119 **Construction of plasmids**

120 Genomic sequences of *F. pedrosoi* were accessed at FungiDB database (<http://fungidb.org/>).  
121 The Hygromycin B resistance (*hygR*) cassette driven by *F. pedrosoi gapdh* promoter and *trpC*  
122 terminator was constructed by overlapping PCR. Both 1.1 kb and 0.34 kb related to *FpPgapdh*  
123 (primers Fp6 and Fp7) and *FpTtrpC* terminator (primers Fp3 and Fp5), respectively were PCR  
124 amplified from the genomic DNA of CBS271.37, while pAN7.1 (Punt et al., 1987) was used as the  
125 template for *hph* (Hygromycin B phosphotransferase) amplification with primers Fp1 and Fp2. To  
126 construct the final cassette, the three fragments were fused by overlapping PCR (primers Fp10 and  
127 Fp11) and the *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* construct was cloned into pBluescript KS+ linearized with  
128 *BamHI* and *EcoRV*. The final construct was inserted into competent *E. coli* via heat shock method  
129 and selected on LB agar with 100 µg/mL Ampicillin. The insertion was confirmed after *BamHI* and  
130 *EcoRV* digestion, and the plasmids named pFpHYG (**Fig. 1A**) were used for biolistic transformation  
131 of conidia. For construction of Neomycin and Nourseothricin resistance cassettes, the same strategy  
132 was used. The resistance genes were placed under control of *Aspergillus nidulans trpC* promoter and  
133 *F. pedrosoi* actin terminator. The 0.37 kb of *AnPtrpC* promoter was amplified from plasmid  
134 pSILENT-1 (Nakayashiki et al., 2005) using the primers the Fp86 and Fp87. *F. pedrosoi* CBS 271.87  
135 gDNA was used as template for the amplification of 0.43 kb DNA fragment related to *FpTact*  
136 (primers Fp81 and Fp85). The genes that confer resistance to Neomycin/ G418 (0.93 kb) (*neo*:  
137 aminoglycoside phosphotransferase) or Nourseothricin (0.72 kb) (*nat*: nourseothricin  
138 acetyltransferase) were PCR amplified with same primers Fp82 and Fp83 from pPZPNEO and  
139 pPZPNAT (Walton et al., 2005), respectively, as both genes are flanked by the same sequences on  
140 these plasmids. To construct the final cassettes, the three fragments were fused by overlapping PCR,  
141 resulting in 1.73 kb *AnPtrpC::neo::FpTact* and 1.52 kb *AnPtrpC::nat::FpTact* products, which were  
142 ligated into pGEMT-Easy (PROMEGA). The insertion of the cassettes were confirmed by *NotI*  
143 digestion, and the plasmids named pFpNEO and pFpNAT were used for biolistic transformation of  
144 conidia. The constructed plasmids are represented on **Fig.1A**.

145 An *Agrobacterium* compatible plasmid (Ti-plasmid) was constructed by inserting the cassette  
146 *FpPgapdh::hph::FpTtrpC* (2.46 kb) from pFpHYG into *BamHI/ SalI* of pPZPNAT (Walton et al.,  
147 2005), after release of *nat* cassette with *EcoRI*. This new plasmid named pPZPFpHPH (**Fig.1B**) was  
148 inserted into competent *Agrobacterium* cells (EHA105 strain) prepared according to Holsters et al.,  
149 1978 and those carrying the plasmid were selected for *Agrobacterium*-mediated transformation of *F.*  
150 *pedrosoi* conidia. Sequences of oligonucleotides are available at **Supl. Table 1**.



## 151 **Biolistic Transformation**

152  $1.3 \times 10^9$  intact conidia of *F. pedrosoi* were collected as previously described and seeded on  
153 the surface of sterile cellophane membrane allocated in Petri dish containing SDA without osmotic  
154 stabilizer. The plates were dried in a sterile laminar flow hood for 1-2 h. Our previous tests showed  
155 that *F. pedrosoi* has a slow growth in the presence of mannitol and sorbitol, two well-established  
156 osmotic stabilizer sugars used in biolistic protocol, for this reason, we decided to not use them on  
157 SDA to recovery the cells after bombardment (data not shown).

158 Tungsten particles M10 (~0.7  $\mu\text{m}$  diameter, Biorad) were used to carry the DNA to be  
159 transformed. The particles preparation was modified from Toffaletti et al. (1993). Briefly, 30 mg of  
160 particles were sterilized with 1 mL of 70 % ethanol for 20 minutes under agitation, centrifuged at full  
161 speed for 10 min and then the supernatant was removed. The particles were washed three consecutive  
162 times with 1 mL of sterile milliQ water, centrifuged at full speed for 10 min, the supernatant discarded  
163 and the particles resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of 50 % sterile glycerol. Fifty microliters of sterile particles  
164 were subjected to ultrasound bath incubation for 7 minutes followed by vortexing for 2 minutes and  
165 5  $\mu\text{L}$  DNA (containing 1  $\mu\text{g}$  DNA for each plate to be transformed) were added to 50  $\mu\text{L}$  sterile  $\text{CaCl}_2$   
166 (2.5 M) and 20  $\mu\text{L}$  sterile spermidine (0.1 M) (Sigma). The mixture was vortexed at the lowest speed  
167 for 10 minutes and precipitated for 10 seconds at full speed. The supernatant was discarded and 150  
168  $\mu\text{L}$  of absolute ethanol was added to wash the particles. Three washes were performed and at the end  
169 of the last wash, the particles were resuspended in absolute ethanol and aliquots of 4  $\mu\text{L}$  were  
170 distributed to the sterile macro carrier membrane (Biorad) loaded in the metal discs. The discs were  
171 incubated in a desiccator for drying for at least 30 minutes prior to bombardment. The device used  
172 was the Biolistics PDS-1000 / He Particle Delivery System (Biorad). The bombardment followed the  
173 manufacturer's instructions, the distance between the Helium source and the flying disc was 1 cm and  
174 the distances between the particle launch site and the target cells 6 and 9 cm were tested. The vacuum  
175 applied to the chamber was 26 mmHg and the Helium pressure was set to 1,350 psi. All plasmids  
176 were transformed in its circular form.

177 After the bombardment, the plates were wrapped in aluminum foil and incubated at 25°C for  
178 24 or 48 hours for recovery of the cells. After the incubation period, the cellophane membrane was  
179 washed with saline (0,9% NaCl) solution to remove the conidia, which were seeded onto SDA  
180 containing 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Hygromycin B, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Nourseotricin or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Neomycin  
181 depending on the inserted plasmid and then incubated at 25°C until the appearance of colonies. After  
182 colony growth in selective media, the potential mutants were tested for mitotic stability after three  
183 consecutive passages on nonselective media. The insertion of the *hyg*, *nat* or *neo* genes into the  
184 genome of the transformants was confirmed by PCR. At least three independent experiments were

185 performed in duplicate to evaluate the tested parameters, distance of the particles launch site to target  
186 cells (6 or 9 cm) and recovery time of the cells after bombardment (24 or 48 h).

### 187 ***Agrobacterium*-mediated transformation**

188 The *Agrobacterium*-mediated transformation protocol was adapted from Michielse et al.  
189 (2008). *F. pedrosoi* conidia were purified and adjusted to desired density, as aforementioned for  
190 biolistic. Plasmids pPZPFHPH (constructed in this work; **Fig. 1B**) and pAD1625 (Abuodeh et al.,  
191 2000), which contain *FpPgapdh::hph::FpTrpC* and *NcPcpc-1 (Neurospora crassa)::hph::AnTrpC*  
192 (*A. nidulans*), respectively were inserted into the *A. tumefaciens* EHA105. The resulting strains were  
193 stored at -80°C until use, and were inoculated in LB agar plus antibiotics (pAD1625 - 100 µg/mL  
194 Ampicillin and pPZPFHPH - 40 µg/mL Kanamycin), incubated at 28°C for 48 h. Two large  
195 *Agrobacterium* colonies were inoculated in 10 mL of LB broth with antibiotics and incubated at 28°C  
196 under 250 rpm overnight. The cells were centrifuged the next day at 2,400 × g for 10 minutes at room  
197 temperature. The supernatant was removed and the cells resuspended in 5 mL of saline (0.9% NaCl)  
198 and centrifuged again for 5 minutes at 2,400 × g. The supernatant was discarded and the cells  
199 resuspended in 10 mL of Induction (IM) medium (Michielse et al., 2008) with 0.2 mM  
200 Acetosyringone (AS) and 40 mM MES (2- (2-methoxyphenyl) N-morpholino) ethane sulfonic acid.  
201 The cell density at OD<sub>600nm</sub> was adjusted to 0.2 - 0.3 and incubated at 28°C under 100 rpm for 4 to 8  
202 hours until reached OD<sub>600nm</sub> of 0.6 - 0.8. *Agrobacterium*: conidia ratios were adjusted to 1: 1, 10: 1  
203 and 100: 1, the conidia were set up to 1.0×10<sup>8</sup> or 1.0×10<sup>6</sup> and then the mixture were plated directly  
204 on the surface of IM Agar supplemented with AS and MES (Michielse et al., 2008). The co-  
205 cultivation plates were incubated at 25°C for 48 or 72 h (co-culture time). The cells were harvested,  
206 seeded on SDA supplemented with cefotaxime (200 µM) and Hygromycin B (50 µg/mL) and  
207 incubated at 25°C until colonies appeared. After the emergence of colonies, putative transformants  
208 were randomly selected for mitotic stability tests, genomic DNA extraction and PCR to confirm the  
209 integration of the selective marker in the mutant genome. At least three independent experiments  
210 were conducted.

### 211 **Isolation of genomic DNA of *F. pedrosoi***

212 *F. pedrosoi* wild-type and putative mutants were cultured in Sabouraud liquid medium for  
213 seven days under shaking at 200 rpm at 28 °C were collected by centrifugation for five minutes, and  
214 the supernatant was discarded. The cells were frozen in liquid nitrogen for one minute and mixed  
215 with 0.5 mL of TENTS buffer (2 % Triton, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl and 1%  
216 SDS) and acid washed glass beads (0.6 µm). The cells were disrupted twice for two minutes at 33 Hz  
217 using the Tissue Lyser cell rupture system (QIAGEN). Briefly, 0.5 mL of Phenol: Chloroform:

218 Isoamyl Alcohol (25:24:1) (Sigma) was added, vigorously stirred for 5 seconds and centrifuged for 5  
219 minutes at full speed. After the transference of the aqueous phase to a new tube containing 50  $\mu$ L of  
220 5 M NaOAc and the addition of 1 mL of absolute ethanol, it was centrifuged for fifteen minutes at  
221 full speed. The pellet was washed with 200  $\mu$ L of 70 % ethanol. Excess alcohol was drained with the  
222 pipette and the tubes were air dried at room temperature for five minutes. The DNA was dissolved in  
223 50  $\mu$ L MilliQ water containing 100  $\mu$ g/mL RNase A, and incubated at 37°C for 2 hours.

#### 224 **PCR and DNA hybridization analyses**

225 gDNA of the transformants were PCR amplified to detect the genes conferring antibiotic  
226 resistance. The primers used for each selective marker are described on **Supl. Table 1**, as follows  
227 *hph* (Fp1 and Fp2 – 1 kb), *nat* (Fp 82 and Fp 83 - 0.72 kb) and *neo* (Fp 82 and Fp 83 - 0.93 kb). All  
228 reactions used One Taq DNA polymerase (NEB), following supplier's instructions. To estimate the  
229 number of *hph* integrations on random selected *hygR* transformants, 10  $\mu$ g of total DNA previously  
230 digested with *Bgl*III (NEB) were separately on 1 % agarose gel electrophoresis, and capillary  
231 transferred to Hybrond N+ (GE) membrane. *Bgl*III is a single cutter on pAN7.1, pFpHYG (**Fig.1A**)  
232 and T-DNA of pAD1625 and pPZPFpHPH (**Fig.1B**). A 0.62 kb of *hph* Digoxigenin-labeled fragment  
233 (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) was the probe in hybridization procedure accordingly to the  
234 manufacturer's instructions (DIG Easy Hyb Granules, Roche). After hybridization, the membrane was  
235 washed (Dig Wash and Block Buffer Set, Roche), and detected with Alkaline phosphatase and CDP-  
236 Star conjugated Anti-digoxigenin Fab Antibody (CDP - Star Detection Reagent, Roche). The signal  
237 was captured by ImageQuant LAS 4000 (GE) equipment. The untransformed *F. pedrosoi* total  
238 genomic DNA was used as negative control, while, the positive control were pAN7.1, pFpHYG and  
239 pPZPFpHPH digested with *Bgl*III.

#### 240 **Obtaining of *F. pedrosoi* mutants expressing GFP**

241 To generate GFP (green fluorescent protein) mutants, the gGFP plasmid kindly donated by  
242 Dr. A. Sharon (Maor et al., 1998) was biolistic inserted into *F. pedrosoi* conidia, and the putative  
243 transformants selected by 100  $\mu$ g/mL of Hygromycin B. The resistant colonies were screened by  
244 fluorescence microscopy to detect GFP expression on Axiovert 100, Carl Zeiss microscope using the  
245 Filter Set 38 HE. The green fluorescent mutants randomly selected, had the genomic DNA isolated  
246 and PCR amplified with Fp1 and Fp2 primers to detect the *hph* gene. The untransformed *F. pedrosoi*  
247 total genomic DNA was used as negative control

#### 248 **Statistical analyzes**

249 The obtained data summarizing the parameters and conditions tested in the genetic  
250 transformation experiments were analyzed using GraphPad Prism version 6.01 for Windows  
251 (GraphPad Program). The normality of the data distribution was verified using the Shapiro-Wilk test.  
252 Two-way ANOVA with Tukey's post-test was used to compare the variations between groups with  
253 more than one variable. The One-Way ANOVA test with Tukey post-test was used to compare the  
254 variations between groups.

## 255 **Results**

### 256 ***F. pedrosoi* susceptibility to the dominant selective markers**

257 To determine the susceptibility of the wild-type strain of *F. pedrosoi* to Hygromycin B,  
258 Nourseothricin and Neomycin/Geneticin/ G418, varying amounts of conidia were spread onto SDA  
259 plates supplemented with the antibiotics at concentrations. Results showed *F. pedrosoi*, strain CBS  
260 271.37, is extremely susceptible to the antibiotics Hygromycin B and Nourseothricin (**Fig. 2**), as the  
261 conidia germination was inhibited at the three doses tested, thus establishing the 50 µg/mL as the  
262 minimum concentration for transformation selection. Differently, 25 and 50 µg/mL of Neomycin  
263 were not sufficient to inhibit conidia germination (**Fig. 2**). Therefore, 100 µg/mL of Neomycin was  
264 considered the selective concentration for genetic transformations of *F. pedrosoi*. It is noteworthy  
265 that the plates were submitted to grow up to 30 days so that the appearance of natural resistant colonies  
266 could be detected.

## 267 **Figure 2**

### 268 **Biolistic transformation of *F. pedrosoi* and mitotic stability of hygR mutants**

269 *F. pedrosoi* strain CBS 271.37 successfully generated Hygromycin B resistant transformants  
270 after conidia bombardment with the two circular vectors tested pFpHYG and pAN7.1. The number  
271 of transformants were collected from a succession of independent experiments and subjected to  
272 statistical analysis to identify the best parameters to transform *F. pedrosoi*. The results are  
273 summarized in **Table 1** and plotted on **Fig. 3**. The mean of transformants recovery ranged from 35-  
274 42 per µg of pFpHYG and 18-45 per µg of pAN7.1, independent of the condition tested. Due to the  
275 standard deviation of the samples, the statistical tests showed no significant difference between the  
276 evaluated conditions: (1) distance of the particles to the target cells - 6 and 9 cm and (2) recovery  
277 time of the cells after bombardment - 24 and 48 hours. However, the data obtained with the plasmid  
278 pFpHYG (constructed in this work) and those generated by pAN7.1 transformation, pointed 6 cm of  
279 distance with cell recovery time of 24 hours, as the parameters that yielded the highest number of  
280 colonies.

281 **Table 1**

282 **Figure 3**

283 *F. pedrosoi* transformants grew in non-selective medium with normal growth rate, and  
284 morphology and aspects of the colonies were dark pigmented velvet due to melanin production  
285 similarly to the parental strain. The mitotic stability of 62 randomly chosen transformants was  
286 evaluated after three subsequent transfers on SDA supplemented or not with 50 µg/mL Hygromycin  
287 B, and 82.3% of putative mutants (n=50) retained their Hygromycin B resistance (**Fig. Supl. 1A**).  
288 Four stable and one non-stable transformant were selected and inoculated on Sabouraud liquid  
289 medium to extract genomic DNA to confirm the presence of the *hph* in their genome. **Fig. supl. 2A**  
290 (lanes 1, 2, 3 and 5) shows the amplification of predicted 1 kb product related to *hph* ORF using the  
291 primers Fp1 and Fp2, confirming all four stable transformants analyzed have the *hph* inserted in their  
292 genomes, whereas one (**Fig. supl. 2A**; lane 4) which failed to grow in Hygromycin B presented  
293 smaller molecular size bands suggesting chromosomal rearrangements during the recombination.

294

295 **Use of Neomycin and Nourseothricin as additional dominant selection markers in the genetic**  
296 **transformation system**

297 After establishing the protocol for transforming *F. pedrosoi* by biolistic using *hph* selective  
298 marker, the plasmids pFpNEO and pFpNAT (**Fig. 1A**), were inserted into *F. pedrosoi*. The obtained  
299 transformants were evaluated for mitotic stability (**Fig. supl. 1. B and C**) and subsequent molecular  
300 detection of the resistance genes. From forty-eight selected *natR* mutants, nineteen (40 %), were  
301 unable to grow in selective medium containing 50 µg/mL Nourseothricin, after three rounds in non-  
302 selective medium (**Fig. Supl.1B**), unlike, of the 48 selected *neoR* mutants, 100 % remained stable  
303 mitotically after successive passages in non-selective medium (**Fig. supl.1.C**). The PCR  
304 amplification to detect the resistance genes inserted into *F. pedrosoi* genome was performed in five  
305 *natR* randomly picked colonies and four *neoR*, in both cases, at least one transformant did not  
306 performed as expected since the predicted products of 0.7 kb for *nat* (**Fig. Supl. 2B**, lane 2), or 0.9  
307 kb referred to *neo* (**Fig. Supl. 2C**, lane 2) were absent. The validation of Nat and Neo as additional  
308 selectable markers facilitates the construction of multiple mutant strains and is an important step in  
309 the development of the molecular toolbox for genetic manipulation in *F. pedrosoi*.

310 **Obtaining *F. pedrosoi* GFP mutant**

311 In an attempt to construct *F. pedrosoi* mutants expressing the Green fluorescent protein (GFP),  
312 conidia were biolistic transformed with the plasmid gGFP that has been proven to generate strong  
313 bright fluorescent expression in filamentous ascomycetes (Maor et al., 1998). This plasmid contains

314 a synthetic version of GFP in which Ser65 was replaced with threonine controlled by *gapdh* promoter  
315 of *A. nidulans* (Maor et al., 1998). From 35 *hygR* mitotically stable mutants of *F. pedrosoi* (**Fig. Supl.**  
316 **3**), nine expressed green fluorescence protein after microscopic inspection. Although they  
317 successfully expressed GFP, the fluorescence intensity was variable, and the mutants 3, 11, 28 and  
318 31 produced more fluorescence compared to the other strains (**Fig. 4**). The fluorescence was detected  
319 mainly in the cytoplasm of the hyphal filaments, and was not found in nuclei. In addition, the wild  
320 type fluorescence background was very weak.

## 321 **Figure 4**

### 322 **Establishment of ATMT for *F. pedrosoi***

323 All the experiments used *Agrobacterium* EHA105 strain and intact conidia of *F. pedrosoi* as  
324 receptor for T-DNA. The parameters evaluated for optimization of this system were related to co-  
325 cultivation: time, ratios of bacteria: conidia and number of receptor cells. We also checked if plasmid  
326 genetic background would affect the transformation efficiency. To this end, we use a vector  
327 constructed with *Fonsecaea's gapdh* promoter and *trpC* terminator driving *hph* - pZPFpHPH (**Fig.**  
328 **1B**) and the plasmid pAD1625 containing *hph* under control of *cpc-1* promoter of *Neurospora* and  
329 *Aspergillus trpC* terminator (Aboudeh et al., 2000). The **Fig. 5A** displays the frequency of  
330 Hygromycin B putative transformants per  $10^8$  conidia for both plasmids tested after 72 hours of co-  
331 cultivation with 1:1 and 10:1 of ratios (bacteria: conidia). We observed no significant statistical  
332 difference in relation to the co-culture ratios for both plasmid analyzed - pAD1625 and pZPFpHPH.  
333 However, the ratio 10: 1 resulted in a larger number of transformants (average of 209 and 54 putative  
334 transformants for pAD1625 and pZPFpHPH, respectively) when compared to 1:1 (**Table 3**). In  
335 addition, ATMT with EHA105 harboring pAD1625 provided statistically increased number of *hygR*  
336 transformants with respect to plasmid pZPFpHPH.

## 337 **Figure 5**

### 338 **Table 3**

339 In order to access whether different periods of co-cultivation would affect the rate of *F.*  
340 *pedrosoi* transformants, we use EHA105 containing pAD1625 at 1:1, 10:1 and 100:1 ratios for 48  
341 and 72 hours co-incubated with  $10^6$  conidia. Firstly, the data (**Fig. 5B; Table 4**) clearly show a 5-fold  
342 transformation efficiency reduction when the number of target conidia is decreased from  $10^8$  to  $10^6$   
343 (for comparison 10:1 ratio – 72 hours of co-cultivation: average of 41 transformants per  $10^6$  conidia  
344 versus 209 transformants per  $10^8$  conidia). Regarding the co-cultivation duration, our statistical  
345 analyses indicate a longer incubation time (72 hours) yield the highest frequency of transformation,  
346 independent of the cell ratios applied (**Fig. 5B; Table 4**). It is worth noting that changing the bacteria:

347 conidia ratio from 1:1 to 1:10 or 1:100 led to a 4-40-fold increase in transformation efficiency after  
348 co-cultivation of EHA105/pAD1625 for 72 and 48 hours, respectively. Regarding the other  
349 parameters to be consider, it is important to note that co-culture temperature (25°C) and use of  
350 Acetosyringone for *Agrobacterium* induction and during the co-cultivation period, were not altered  
351 in all the experiments performed.

352

#### 353 **Table 4**

354 *Agrobacterium* –mediated transformation of the *F. pedrosoi* produced 100 % mitotically  
355 stable transformants with colonies of parental morphology and velvet-melanized aspect on SDA  
356 plates with or without Hygromycin B (**Fig. suppl. 4A-B**). A PCR assay with primers Fp1 and Fp2  
357 tested for the integration of the *hph* gene into the genomes of the three putative transformants for each  
358 plasmid tested, all of six exhibited 1 kb expected product, but not the wild type strain as expected  
359 (**Fig. suppl. 4C**).

360

#### 361 **Southern Blot analysis of *F. pedrosoi* putative transformants**

362 To investigate the integration pattern and estimate the copy number of the *hph* in the putative  
363 transformants, the genomic DNA was isolated from fourteen PCR- positive and mitotically stable  
364 transformants – eight from pAN7.1 and pFpHYG transformation, and six from ATMT and used for  
365 Southern blot hybridization. The genomic DNAs were digested with *Bgl*III followed by hybridization  
366 with a Digoxigenin-labeled fragment of 0.6 kb corresponding to *hph* gene as the probe. *Bgl*III  
367 recognition site is not within the *hph* gene, but this enzyme cuts once each plasmid or T-DNA used  
368 in this work. The results showed that hybridization bands were detected in all transformants analyzed  
369 whereas no signal was visualized in the non-transformed strain CBS271.37. The positive controls  
370 pAN7.1, pFpHYG and pZPFpHPH linearized with *Bgl*III presented a single band of 6.8 kb, 5.4 kb  
371 and 9.2 kb, respectively. **Fig. 6A** lanes 1-4 depict the transformants generated by biolistic that were  
372 bombarded with pAN7.1 (which exhibits heterologous promoter and terminator sequences from  
373 *Aspergillus*). Three of four mutants presented multiple integrations of *hph* gene; lanes 1 and 3 have  
374 two integrations while lane 4 displayed five insertions. Just one transformant (lane 2) had a single  
375 copy of *hph* into its genome. All the four mutants obtained by pFpHYG (plasmid containing *F.*  
376 *pedrosoi* homologous sequences controlling the *hph* gene) (**Fig. 6A lanes 5-8**) showed multiple  
377 integrations with different patterns in the genome. Interesting a 6 kb insertion was detected in all the  
378 four analyzed mutants, possible indicating a full plasmid integration on a specific site of the genome  
379 favored by the *F. pedrosoi* homologous sequences driving *hph* expression. The transformants  
380 obtained by *Agrobacterium* containing pAD1625 received only a single copy of the full T-DNA as  
381 the three transformants evaluated presented fragments above 4.8 kb (**Fig. 6B lanes 1-3**). Differently,

382 we observed that two of three mutants obtained by ATMT using pPZPFpHPH, have two insertions  
383 of the T-DNA (**Fig. 6B** lanes 5 and 6) with hybridizations of ~4.5 and 6 kb (T-DNA of pPZPFpHPH  
384 corresponds to 3 kb), while just one mutant (**Fig. 6B** lane 4) had single integration of the T-DNA.  
385 These results confirmed that the exogenous gene *hph* was successfully integrated into the genome of  
386 *F. pedrosoi* and both methods efficiently generated stable transformants.

387

## 388 **Figure 6**

### 389 **Discussion**

390 Although methods of genetic transformation by biolistic and mediated by *Agrobacterium* have  
391 been powerfully applied as genetic manipulation tools for several fungal species in recent years, it  
392 remains unknown whether both techniques could be used in *F. pedrosoi*. In this study, we described  
393 that ATMT and biolistic are reliable, feasible and promising techniques to generate stable *F. pedrosoi*  
394 transformants, and this is the first report of this important etiological agent of CBM has been  
395 genetically manipulated.

396 Biolistic is already used in other fungi for more than two decades (Armaleo et al., 1990; Lorito  
397 et al., 1993; Toffalietti et al., 1993; Hilber et al., 1994; Fungaro et al., 1995; Gonzalez - Hernandez,  
398 et al., 1997; Barreto et al., 1997; Yu and Cole, 1998; Inglis et al., 2000; Meyer et al., 2003; and  
399 others). Armaleo et al. (1990) described firstly the physical and biological variables underlying the  
400 transformation efficiency in yeast such as constitution, size, concentration and preparation of DNA  
401 carrier particles, genotype, growth phase and density of the target cells, as well as the osmotic  
402 composition of the culture medium used during the bombardment.

403 Other research groups demonstrate that although many transformation systems are available  
404 for genetic manipulation of filamentous fungi, not all of them are suitable for an organism, and thus  
405 appropriate systems must be tested and optimized for each fungus species. The studies reporting  
406 biolistic in filamentous fungi usually evaluate other parameters as, distance between the particle  
407 support device and the target cells, type and age of the cells to be transformed, which in case of  
408 filamentous fungi may be intact or germinated conidia, gas helium pressure, presence of osmotic  
409 stabilizer on the recovery medium, and others (Meyer et al., 2003). Based on the fact that biolistic  
410 protocol is simple, does not require pre-treatment of the cells, and was used to produce stable  
411 transformants in other ascomycetes, we tested two parameters as possible influencers of *F. pedrosoi*  
412 transformation efficiency: the distance between the particle support device (6 and 9 cm) and the time  
413 to recover the bombarded cells (24 and 48 h).



414 We did not observe differences among the variables tested, but the conditions that produced  
415 the higher transformation efficiency for *F. pedrosoi* (15-130 transformants per µg of pFpHYG) were  
416 1,350 psi of helium pressure, 6 cm as the distance between the particles and the target cells and 24  
417 hours of incubation in non-selective medium (without osmotic stabilizer) after bombardment. Te'o et  
418 al. (2002) using the combination of 3 cm distance and 1,350 psi of helium pressure obtained the  
419 highest number of *Trichoderma reesei* transformants (39/µg of DNA). Although, Lorito et al. (1993)  
420 observed for *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* that variation of helium pressure or  
421 biological parameters (such as the age of conidia and the presence of an osmotic stabilizer) did not  
422 alter transformation efficiency. Meyer et al. (2003) evaluated several parameters for *Aspergillus*  
423 *giganteus* and reported that a low helium pressure combined with large distance (15-17 cm) between  
424 the shot device and target cells generates a low efficiency transformation.

425 The mitotic stability of the fungal biolistic transformants varies accordingly to the fungal  
426 species. In our work, we obtained about 82 % of Hygromycin B resistant stable transformants with  
427 growth rate and morphology comparable to the wild type strain. Differently, Lorito et al. (1993)  
428 observed the transformants had faster growth than the wild-type strain. Fungaro et al. (1995) showed  
429 94 % of *A. nidulans* transformants were slower growers than parental strain, but mitotically stable,  
430 differently of *Botryotinia fuckeliana*, (Hilber et al., 1994), in which four of eight transformants  
431 stopped growing when incubated in non-selective medium.

432 The biolistic method has some important advantages in comparison to ATMT such as the  
433 possibility of using different genetic materials, as the genomic and plasmidial DNA (Lorito et al.,  
434 1993; Aragão et al., 2009) or PCR amplified fragments, but one of the disadvantages is that the  
435 transformants are less stable with multiple copy integrations into the genome. In our work, we  
436 observed the number of genomic insertions is variable (from one to six) and dependent upon the  
437 plasmid used to transform the cells. Other authors also report this diversity of integrations in  
438 filamentous fungi, Gonzalez-Hernandez et al., 1997 described 2 to 3 copies of the plasmid into the  
439 genome of the *Mucor circinelloides* transformants. The same was reported by Barreto et al. (1997)  
440 after analysis of *Paecilomyces fumosoroseus* mutants as well as Lorito et al. (1993) for *T. harzianum*  
441 and *G. virens*. In opposite way, Hilbert et al. (1994) found single non-homologous integrations in *B.*  
442 *fuckeliana* and Yu and Cole (1998) showed that two of the six evaluated transformants of *C. immitis*  
443 also had unique inserts.

444 The *Agrobacterium*-mediated genetic transformation was firstly reported for filamentous  
445 fungi by de Groot et al. (1998), and has been explored to several other species, including, *Aspergillus*  
446 (Kunitake et al., 2011; Michielse et al., 2008; Mora-Lugo et al., 2014; Sugui et al., 2005),

447 *Cladosporium* (Zhang et al., 2011), *Coccidioides immitis* (Abuodeh et al., 2010), *Colletotrichum*  
448 (Auyong et al., 2012; Flowers et al., 2005; Nakamura et al., 2012), *Guignardia citricarpa* (Figueiredo  
449 et al., 2010), *Fusarium* (Bernardi-Wenzel et al., 2016; Islam et al., 2012; Mullins et al., 2001),  
450 *Metarhizium* (Duarte et al., 2007; Fang et al., 2006; Staats et al., 2007), *Talaromyces* (*Penicillium*)  
451 (Kummasook et al., 2010; Wang and Li, 2008; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2013), *Sporothrix*  
452 *schenckii* (Zhang et al., 2011), *Trichoderma sp.* (Zeilinger, 2004; Zhong et al., 2007; Zhong et al.,  
453 2011) and others (for detailed review Frandsen, 2011). This is a powerful molecular tool for DNA  
454 manipulation as it does not require specific equipment and it is not limited to a particular organism,  
455 species, or cell type. Many authors described the major *Agrobacterium* variables for transformation  
456 are co-culture conditions - the ratio between bacterium and fungus, incubation time and temperature,  
457 and the *Agrobacterium* strains (the most used LBA4404, AGL-1 and EHA105) (Lima et al., 2006;  
458 Shao et al., 2016; Zeilinger, 2004). In the present work, we evaluated if *Agrobacterium* would be able  
459 to transfer the T-DNA containing *hph* to intact conidia of *F. pedrosoi*. We observed that the tested  
460 parameters (time of co-cultivation, proportion between *Agrobacterium* and conidia and number of  
461 target cells) affected the transformation efficiency of *F. pedrosoi*.

462 Conidia of *F. pedrosoi* were successfully transformed by *Agrobacterium* EHA105 strain.  
463 According to Zhang et al. (2008), this strain has a high level of *vir* expression, resulting in a better  
464 frequency of transformants. We did not obtain any *hygR* colonies when we use LBA4404 (data not  
465 shown), the same was previously reported for other fungal species (Fang et al., 2006; Nakamura et  
466 al., 2012). The conditions that generated the highest number of *F. pedrosoi* transformants (average  
467 of 209 per  $10^8$  conidia) were a ratio 10:1 (*Agrobacterium*: conidia) and a co-cultivation period of 72  
468 hours with the EHA105 carrying the pAD1625 (Abuodeh et al., 2000). This plasmid improved  
469 transformation rates in plants and fungi as it has mutations that constitutively express all *vir* genes  
470 and another that allows high plasmid copy numbers (Abuodeh et al., 2000; Hansen et al., 1994).  
471 Zhong et al. (2007) and Zhang et al. (2013) reported that the efficiency of transformation is directly  
472 correlated with the initial number of the target conidia. We observed for *F. pedrosoi*, a 6-fold  
473 enhancement on transformants number when we use of  $10^8$  instead of  $10^6$  conidia. Most studies of  
474 fungal ATMT stated the transformants were mitotically very stable (Duarte et al., 2007; Fang et al.,  
475 2006; Figueiredo et al., 2010; Rho et al., 2001), on the same way all *F. pedrosoi* transformants  
476 analyzed were stable after three rounds of non-selective growth. Abuodeh et al. (2000), described the  
477 use of germinated, instead of intact spores increased the efficiency of the *C. immitis* transformation.  
478 In the present work, we used *F. pedrosoi* intact conidia, however we can exploit in the future if  
479 germination of conidia have any effect on the number of transformants.

480 Concerning to the number of T-DNA genomic integrations on the *F. pedrosoi* after ATMT,  
481 we observed the transformants obtained by pAD1625 had single insertions while those that have in  
482 T-DNA *hph* controlled by homologous sequences had one or two hybridized fragments. Previous  
483 studies such as Meyer et al. (2003) have also tested various transformation techniques for *A.*  
484 *giganteus*, including biolistic and ATMT, and verified that the transformants obtained by  
485 *Agrobacterium* present only one insertion of the resistance gene in the genome. Several other studies  
486 have reported single inserts, such as for *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus awamori*, *Calonectria*  
487 *morganii* and *Suillus bovinos* (de Groot et al., 1998, Malonek and Meinhardt 2001, Mullins et al.,  
488 2001). Thus, the *Agrobacterium*-mediated transformation method appears to be a more feasible  
489 approach for random insertional mutagenesis in black fungi as well, and homologous recombination  
490 for labeling or gene disruption, as compared to the bombardement of DNA-coated particles.

491 Selective markers other than *hygR* have been extensively explored in eukaryotic systems. In  
492 fungi, the use of different dominant markers has been opening new strategies and experimental  
493 designs in the functional study of genes, since in combination; the markers can be employed for  
494 deletion cassette constructs or multiple gene deletions, for genetic complementation of mutant to  
495 rescue wild type phenotype as well for gene overexpression experiments (Sureka et al., 2014). In  
496 addition, these dominant markers are not restricted to a single species. In this work, we observed *F.*  
497 *pedrosoi* is susceptible to Nourseothricin and Geneticin, and we used the antibiotic resistance genes:  
498 *nat* and *neo* to construct cassettes driven by *Aspergillus trpC* promoter and *F. pedrosoi act* terminator.  
499 Other groups have already employed *AnPtrpC* because it is effective in the transcription of various  
500 filamentous fungi (Hamer and Timberlake, 1987; Nakayashiki et al., 2005; Sureka et al., 2014). We  
501 obtained stable *F. pedrosoi* transformants expressing the *natR* and *neoR*, making those selective  
502 markers also available for several molecular biology techniques.

503 Fluorescent proteins such as GFP, dsRed, mCherry for the labeling of cells and tagging  
504 proteins have been widely used in microorganisms. The construction of reporter strains in pathogenic  
505 microorganisms is also an important molecular tool since it allows the monitoring of live pathogen  
506 cells and their interactions with the host in a real-time way (Buron-Moles et al., 2012; Heber and  
507 Requena, 2009; Maciá-Vicente et al., 2009; Navarro-Velasco et al., 2011; Nizam et al., 2010; Voelz  
508 et al., 2010). In the present study, we obtained mitotically stable *F. pedrosoi* GFP tagged mutants by  
509 biolistic using gGFP plasmid previously constructed (Maor et al., 1998). The green fluorescence was  
510 microscopically detected on the cytoplasm of the hyphal but not on the nuclei or on the conidia.  
511 Aboul-Soud et al. (2004) used the same plasmid to obtain fluorescent mutant of *F. oxysporum* and  
512 reported strong expression of GFP distributed in the cytoplasm (absent in the nucleus) of the  
513 transformed hyphae. These authors also reported the GFP expression was variable among the

514 transformants, as several did not show detectable fluorescence, comparable to the wild strain, the  
515 same we observed for *F. pedrosoi* in this work. The use of GFP-tagging has many advantages as this  
516 protein is resistant to light degradation (Cubitt et al., 1995), has low toxicity to the cells and does not  
517 require a substrate to fluoresce due to its auto catalytic production (Aboul-Soud et al., 2004).  
518 Considering the lack of molecular and dynamic studies for the understanding of the biology and  
519 pathogenicity mechanisms of *F. pedrosoi*, the use of GFP-labeled strain may be of great relevance  
520 for the studies of the interaction of this fungus with the human host and with the plant - its potential  
521 reservoir in the environment.

522 The data we report in this work demonstrated that the use of biolistic for the genetic  
523 transformation of *F. pedrosoi* intact conidia is effective, as well as ATMT. Particle bombardment is  
524 a simple and faster method compared to *Agrobacterium*, which despite the longer protocol; it has a  
525 better efficacy to produce stable transformants with less genomic insertions. In addition, biolistic is a  
526 more expensive technique when compared to ATMT, requiring specific supplies and equipment. This  
527 is the first study in which a strain of *Fonsecaea* has been genetically transformed. The molecular tools  
528 presented here enable us to open new ways for future reverse and forward genetic approaches as well  
529 as genomic editing techniques such as CRISPR-Cas9 in *F. pedrosoi* to better understand of its  
530 pathobiology. Those methods and tools may also be exploit for the other causative agents of CBM.

### 531 **Authors' contributions**

532 Conceived and designed the experiments: LF and CSF. Performed the experiments: LF, CSF.  
533 Analyzed the data: LF, CSF and FASB. Contributed to reagents/material/analysis tools: ALB, LF,  
534 MMT, VAV and MSSF. Wrote the paper: CSF and LF.

### 535 **Acknowledgments**

536 We thank Dr. Alex Idnurn for kindly donation of the pPZPNAT, pPZPNEO and pPZPHYG plasmids,  
537 Dr. Aaron Sharon for the gGFP and Dr. John Galgiani for pAD1625. Financial support for this  
538 research was provided by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF Project  
539 0193.000.938/2015) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) for graduate students' grants.

### 540 **References**

541 Aboul-Soud, M.A., Yun, B.W., Harrier, L.A., Loake, G.J., 2004. Transformation of *Fusarium*  
542 *oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing  
543 a GFP transgene. Mycopathologia. 158, 475-482.

544 Abuodeh, R.O., Orbach, M.J., Mandel, M.A., Das, A., Galgiani, J.N., 2000. Genetic transformation  
545 of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Infect. Dis. 181, 2106-2110.

546 Aragão, F.J., Barros, L.M., Brasileiro, A.C., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C.,  
547 Rech, E.L., 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-  
548 transformed via particle bombardment. Theor. Appl. Genet. 93, 142-150.

549 Armaleo, D., Ye, G.N., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C., Johnston, S.A., 1990. Biolistic  
550 nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. Curr. Genet. 17, 97-103.

551 Auyong, A.S., Ford, R., Taylor, P.W., 2012. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum*  
552 associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. J. Basic.  
553 Microbiol. 52, 372-382.

554 Barreto, C.C., Alves, L.C., Aragão, F.J., Rech, E., Schrank, A., Vainstein, M.H., 1997. High  
555 frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the  
556 entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. FEMS Microbiol. Lett. 156, 95-99.

557 Bernardi-Wenzel, J., Quecine, M.C., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., 2016. *Agrobacterium*-mediated  
558 transformation of *Fusarium proliferatum*. Genet. Mol. Res. 15, 2.

559 Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P.J., 1995. Trans-kingdom T-DNA  
560 transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14, 3206-3214.

561 Buron-Moles, G., López-Pérez, M., González-Candelas, L., Viñas, I., Teixidó, N., Usall, J., Torres,  
562 R., 2012. Use of GFP-tagged strains of *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum* to study  
563 host-pathogen interactions in oranges and apples. Int. J. Food Microbiol. 160, 162-170.

564 Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y., 1995. Understanding,  
565 improving and using green fluorescent proteins. Trends Biochem. Sci. 20, 448-455.

566 Cunha, M.M., Franzen, A.J., Seabra, S.H., Herbst, M.H., Vugman, N.V., Borba, L.P., de Souza, W.,  
567 Rozental, S., 2010. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. BMC Microbiol.  
568 10, 80.

569 de Azevedo, C.M., Gomes, R.R., Vicente, V.A., Santos, D.W., Marques, S.G., do Nascimento, M.M.,  
570 Andrade, C.E., Silva, R.R., Queiroz-Telles, F., de Hoog, G.S. 2015. *Fonsecaea pugnacius*, a novel  
571 agent of disseminated chromoblastomycosis. J. Clin. Microbiol. 53, 2674-2685.

572 De Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J., Beijersbergen, A.G., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-  
573 mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. 16, 839-842.

574 Duarte, R.T., Staats, C.C., Fungaro, M.H., Schrank, A., Vainstein, M.H., Furlaneto-Maia, L.,  
575 Nakamura, C.V., de Souza, W., Furlaneto, M.C., 2007. Development of a simple and rapid

576 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus  
577 *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Lett. Appl. Microbiol. 44, 248-254.

578 Fang, W., Pei, Y., Bidochka, M.J., 2006. Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by  
579 *Agrobacterium tumefaciens*. Can. J. Microbiol. 52, 623-626.

580 Figueiredo, J.G., Goulin, E.H., Tanaka, F., Stringari, D., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L.V,  
581 Staats, C.C., Schrank, A., Glienke, C., 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation  
582 of *Guignardia citricarpa*. J. Microbiol. Methods. 80, 143-147.

583 Flowers, J.L., Vaillancourt, L.J., 2005. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium*  
584 *tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. Curr. Genet. 48, 380-388.

585 Frandsen, R.J., 2011. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in  
586 fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. J. Microbiol. Methods. 87, 247-  
587 262.

588 Franzen, A.J., Cunha, M.M., Miranda, K., Hentschel, J., Plattner, H., da Silva, M.B., Salgado, C.G.,  
589 de Souza, W., Rozentel, S., 2008. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human  
590 pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. J. Struct. Biol. 162, 75-84.

591 Fungaro, M.H., Rech, E., Muhlen, G.S., Vainstein, M.H., Pascon, R.C., de Queiroz, M.V., Pizzirani-  
592 Kleiner, A.A., de Azevedo, J.L., 1995. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile  
593 bombardment on intact conidia. FEMS Microbiol. Lett. 125, 293-297.

594 Gonzalez-Hernandez, G.A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Ramirez, V., Roncero, M.I.G., Gutierrez-  
595 Corona, J.F., 1997. Biolistic transformation of *Mucor circinelloides*, Mycol. Res. 101, 953-956.

596 Hamer, J.E., Timberlake, W.E., 1987. Functional organization of the *Aspergillus nidulans trpC*  
597 promoter. Mol. Cell. Biol. 7, 2352-2359.

598 Hansen, G., Das, A., Chilton, M.D., 1994. Constitutive expression of the virulence genes improves  
599 the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91, 7603-  
600 7607.

601 He, L., Feng, J., Lu, S., Chen, Z., Chen, C., He, Y., Yi, X., Xi, L., 2017. Genetic transformation of  
602 fungi. Int. J. Dev. Biol. 61, 375-381.

603 Helber, N., Requena, N., 2008. Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a  
604 nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. New Phytol.  
605 177, 537-548.

606 Hilber, U.W., Bodmer, M., Smith, F.D., Köller, W., 1994. Biolistic transformation of conidia of  
607 *Botryotinia fuckeliana*. Curr. Genet. 25, 124-127.

608 Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., Schell, J., 1978.  
609 Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 163, 181-187.

610 Islam, M.N., Nizam, S., Verma, P.K., 2012. A highly efficient *Agrobacterium* mediated  
611 transformation system for chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* using DsRed-  
612 Express to follow root colonisation. Microbiol. Res. 167, 332-338.

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

616 Kummasook, A., Cooper, C.R.Jr., Vanittanakom, N., 2010. An improved *Agrobacterium*-mediated  
617 transformation system for the functional genetic analysis of *Penicillium marneffeii*. Med. Mycol.  
618 48, 1066-1074.

619 Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citovsky, V., 2001. Genetic  
620 transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98, 1871-1876.

621 Kunitake, E., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T., 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated  
622 transformation of *Aspergillus aculeatus* for insertional mutagenesis. AMB. Express. 1, 46.

623 Lima, I.G., Duarte, R.T., Furlaneto, L., Baroni, C.H., Fungaro, M.H., Furlaneto, M.C., 2006.  
624 Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium*  
625 *tumefaciens*. Lett. Appl. Microbiol. 42, 631-636.

626 Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., Harman, G.E., 1993. Biolistic transformation of *Trichoderma*  
627 *harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. Curr. Genet. 24, 349-356.

628 Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Talbot, N.J., Lopez-Llorca, L.V., 2009. Real-time PCR  
629 quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots  
630 by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. New Phytol. 182, 213-228.

631 Malonek, S., Meinhardt, F., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of  
632 the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morgani*. Curr. Genet. 40, 152-155.

633 Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B., Sharon, A., 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for  
634 studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. Mycol. Res.  
635 102, 491-496.

636 Marques, S.G., Silva, C.M., Saldanha, P.C., Rezende, M.A., Vicente, V.A., Queiroz-Telles, F., Costa,  
637 J.M., 2006. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya*  
638 *phalerata Martius*) in the Amazon region of Maranhão Brazil. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 47,  
639 305-311.

640 Matveeva, T.V., Lutova, L.A., 2014. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. Front.  
641 Plant. Sci. 5, 326.

642 Menezes, N., Varela, P., Furtado, A., Couceiro, A., Calheiros, I., Rosado, L., Mota, G., Baptista, A.,  
643 2008. Chromoblastomycosis associated with *Fonsecaea pedrosoi* in a carpenter handling exotic  
644 woods. Dermatol. Online J. 14, 9.

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

647 Meyer, V., 2008. Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends.  
648 *Biotechnol. Adv.* 26, 177-185.

649 Michielse, C.B., Hooykaas, P.J., van den Hondel, C.A., Ram, A.F., 2008. *Agrobacterium*-mediated  
650 transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nat. Protoc.* 3, 1671-1678.

651 Mora-Lugo, R., Zimmermann, J., Rizk, A.M., Fernandez-Lahore, M., 2014. Development of a  
652 transformation system for *Aspergillus sojae* based on the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated  
653 approach. *BMC Microbiol.* 14, 247.

654 Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D.M., Kang, S., 2001. *Agrobacterium*-  
655 mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and  
656 gene transfer. *Phytopathol.* 91, 173-180.

657 Najafzadeh, M.J., Sun, J., Vicente, V., Xi, L., van den Ende, A.H., de Hoog, G.S., 2010. *Fonsecaea*  
658 *nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Med.*  
659 *Mycol.* 48, 800-806.

660 Naka, W., Harada, T., Nishikawa, T., Fukushiro, R., 1988. A case of chromoblastomycosis with  
661 special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mycoses.* 31, 70.

662 Nakamura, M., Kuwahara, H., Onoyama, K., Iwai, H., 2012. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated  
663 transformation for investigating pathogenicity genes of the phytopathogenic fungus  
664 *Colletotrichum sansevieriae*. *Curr. Microbiol.* 65, 176-182.

665 Nakayashiki, H., Hanada, S., Nguyen, B.Q., Kadotani, N., Tosa, Y., Mayama, S., 2005. RNA  
666 silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet. Biol.* 42, 275-  
667 283.

668 Navarro-Velasco, G.Y., Prados-Rosales, R.C., Ortíz-Urquiza, A., Quesada-Moraga, E., Di Pietro, A.,  
669 2011. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*.  
670 *Fungal Genet. Biol.* 48, 1124-1129.

671 Nizam, S., Singh, K., Verma, P.K., 2010. Expression of the fluorescent proteins DsRed and EGFP to  
672 visualize early events of colonization of the chickpea blight fungus *Ascochyta rabiei*. *Curr. Genet.*  
673 56, 391-399.

674 Olmedo-Monfil, V., Cortés-Penagos, C., Herrera-Estrella, A., 2004. Three decades of fungal  
675 transformation: key concepts and applications. *Methods Mol. Biol.* 267, 297-313.

676 Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H., van den Hondel, C.A., 1987.  
677 Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia*  
678 *coli*. *Gene.* 56, 117-124.



679 Queiroz-Telles, F., de Hoog, S., Santos, D.W., Salgado, C.G., Vicente, V.A., Bonifaz, A., Roilides,  
680 E., Xi, L., Azevedo, C.M., da Silva, M.B., Pana, Z.D., Colombo, A.L., Walsh, T.J., 2017a.  
681 Chromoblastomycosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 233-276.

682 Queiroz-Telles, F., Fahal, A.H., Falci, D.R., Caceres, D.H., Chiller, T., Pasqualotto, A.C., 2017b.  
683 Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect. Dis.* S1473-3099, 30306-30307.

684 Rho, H.S., Kang, S., Lee, Y.H., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the  
685 plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cells.* 12, 407-411.

686 Rivera, A.L., Magana-Ortiz, D., Gomez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A.M., 2014. Physical  
687 methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Phys. Life. Rev.* 11, 184-203.

688 Salgado, C.G., da Silva, J.P., Diniz, J.A., da Silva, M.B., da Costa, P.F., Teixeira, C., Salgado, U.I.,  
689 2004. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source  
690 of chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 46, 33-36.

691 Seyedmousavi, S., Netea, M.G., Mouton, J.W., Melchers, W.J., Verweij, P.E., de Hoog, G.S., 2014.  
692 Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. *Clin.*  
693 *Microbiol. Rev.* 27, 527-542.

694 Shao, C., Yin, Y., Qi, Z., Li, R., Song, Z., Li, Y., Wang, Z., 2015. *Agrobacterium tumefaciens*-  
695 mediated transformation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Fungal Genet. Biol.*  
696 83, 19-25.

697 Silva, C.M., da Rocha, R.M., Moreno, J.S., Branco, M.R., Silva, R.R., Marques, S.G., Costa, J.M.,  
698 1995. The coconut babaçu (*Orbignya phalerata martins*) as a probable risk of human infection by  
699 the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhão, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*  
700 28, 49-52.

701 Silva, J.P., de Souza, W., Rozental, S., 1998. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325  
702 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia.* 143, 171-175.

703 Staats, C.C., Junges, A., Fitarelli, M., Furlaneto, M.C., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2007. Gene  
704 inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium*  
705 *anisopliae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 945-950.

706 Sugui, J.A., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated  
707 transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted  
708 gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1798-1802.

709 Surash, S., Tyagi, A., De Hoog, G.S., Zeng, J.S., Barton, R.C., Hobson, R.P., 2005. Cerebral  
710 phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. *Med. Mycol.* 43, 465-472.

711 Sureka, S., Chakravorty, A., Holmes, E.C., Spassibojko, O., Bhatt, N., Wu, D., Turgeon, B.G., 2014.  
712 Standardization of functional reporter and antibiotic resistance cassettes to facilitate the genetic  
713 engineering of filamentous fungi. *ACS Synth. Biol.* 3, 960-962.

714 Te'o, V., Bergquist, P., Nevalainen, K., 2002. Biolistic transformation of *Trichoderma reesei* using  
715 the Bio-Rad seven barrels Hepta Adaptor system. *J. Microbiol. Methods.* 51, 393-399.

716 Teixeira, M.M., Moreno, L.F., Stielow, B.J., Muszewska, A., Hainaut, M., Gonzaga, L., Abouelleil,  
717 A., Patané, J.S., Priest, M., Souza, R., Young, S., Ferreira, K.S., Zeng, Q., da Cunha, M.M., Gladki,  
718 A., Barker, B., Vicente, V.A., de Souza, E.M., Almeida, S., Henrissat, B., Vasconcelos, A.T.,  
719 Deng, S., Voglmayr, H., Moussa, T.A., Gorbushina, A., Felipe, M.S., Cuomo, C.A., de Hoog,  
720 G.S., 2017. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (*Chaetothyriales*,  
721 *Ascomycota*). *Stud. Mycol.* 86, 1-28.

722 Toffaletti, D.L., Rude, T.H., Johnston, S.A., Durack, D.T., Perfect, J.R., 1993. Gene transfer in  
723 *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J. Bacteriol.* 175, 1405-1411.

724 Vicente, V.A., Attili-Angelis, D., Pie, M.R., Queiroz-Telles, F., Cruz, L.M., Najafzadeh, M.J., de  
725 Hoog, G.S., Zhao, J., Pizzirani-Kleiner, A., 2008. Environmental isolation of black yeast-like fungi  
726 involved in human infection. *Stud. Mycol.* 61, 137-144.

727 Vicente, V. A., Najafzadeh, M.J., Jiufeng, S., Gomes, R.R., Robl, D., Marques, S.G., Azevedo,  
728 C.M.P.S., de Hoog, G.S., 2013. Environmental siblings of black agents of human  
729 chromoblastomycosis. *Fungal Diversity.* 65, 47-63

730 Voelz, K., Johnston, S.A., Rutherford, J.C., May, R.C., 2010. Automated analysis of cryptococcal  
731 macrophage parasitism using GFP-tagged cryptococci. *PLoS One.* 31, e15968.

732 Walton, F.J., Idnurm, A., Heitman, J., 2005. Novel gene functions required for melanization of the  
733 human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 57, 1381-1396.

734 Wang, J.Y., Li, H.Y., 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the  
735 phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9, 823-828.

736 Yu, J.J., Cole, G.T., 1998. Biolistic transformation of the human pathogenic fungus. *J. Microbiol.*  
737 *Methods* 33, 129-141.

738 Zambryski, P., 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant  
739 cells. *Annu. Rev. Genet.* 22, 1-30.

740 Zeilinger, S., 2004. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated  
741 transformation. *Curr. Genet.* 45, 54-60.

742 Zhang, P., Xu, B., Wang, Y., Li, Y., Qian, Z., Tang, S., Huan, S., Ren, S., 2008. *Agrobacterium*  
743 *tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus  
744 *Penicillium marneffeii*. *Mycol. Res.* 112, 943-949.

- 745 Zhang, P., Liu, T.T., Zhou, P.P., Li, S.T., Yu, L.J., 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated  
746 transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2.  
747 Curr. Microbiol. 62, 1315-1320.
- 748 Zhang, T., Qi, Z., Wang, Y., Zhang, F., Li, R., Yu, Q., Chen, X., Wang, H., Xiong, X., Tang, K.,  
749 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Penicillium expansum* PE-12 and  
750 its application in molecular breeding. Microbiol. Res. 168, 130-137.
- 751 Zhong, Y.H., Wang, X.L., Wang, T.H., Jiang, Q., 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation  
752 (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. Appl.  
753 Microbiol. Biotechnol. 73, 1348-1354.
- 754 Zhong, Y., Yu, H., Wang, X., Lu, Y., Wang, T., 2011. Towards a novel efficient T-DNA-based  
755 mutagenesis and screening system using green fluorescent protein as a vital reporter in the  
756 industrially important fungus *Trichoderma reesei*. Mol. Biol. Rep. 38, 4145-4151.  
757

758 **Figure legends**

759 **Fig. 1. Susceptibility of *F. pedrosoi* to Hygromycin B, Nourseothricin and Neomycin.** *F. pedrosoi*  
760 spores were plated at different drug concentrations (0, 25, 50 and 100 µg/mL of each antibiotic). The  
761 plates were incubated at 25° C for 30 days. This is representative of two independent experiments.

762 **Fig. 2. Schematic representation of plasmids constructed in this work carrying resistance gene to**  
763 **Hygromycin B, Nourseothricin and Neomycin.** (A) Plasmids used to biolistic transform *F. pedrosoi*  
764 spores: (1) pFpHYG has Hygromycin resistance cassette cloned in *Bam*HI and *Eco*RV restriction sites  
765 of pBluescript KS+; (2) pFpNAT has Nourseothricin resistance cassette cloned in *Eco*RI restriction site  
766 of pGEMT-Easy (Promega); (3) pFpNEO has Neomycin resistance cassette cloned in *Eco*RI restriction  
767 site of pGEMT-Easy (Promega) (B) Plasmid used for *Agrobacterium* mediated transformation of *F.*  
768 *pedrosoi* spores: pPZPFpHPH has Hygromycin resistance cassette cloned in *Bam*HI and *Sal*I restriction  
769 sites of pPZP-201BK (Walton et al., 2005). The oligonucleotides positions and the size of the fragments  
770 are indicated on the figure. Fp: *Fonsecaea pedrosoi*; An: *Aspergillus nidulans*; *trpC*: Tryptophan  
771 biosynthesis protein, *gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *act*: actin; P: promoter; T:  
772 terminator.

773 **Fig. 3. Efficiency of biolistic transformation of *F. pedrosoi* with the plasmids pFPHYG and**  
774 **pAN7.1.** The number of transformants from at least three independent experiments were plotted for  
775 comparison of the conditions evaluated using (A) pFPHYG and (B) pAN7.1: distance of the particles  
776 macrocarrier to the plated conidia (6 and 9 cm) and time of cells recovery after particle bombardment  
777 (24 and 48 h); the dotted line separated the groups. The bars represent the default error for each group.  
778 Two-way ANOVA and post-test: Tukey were applied for statistical analyses, no significant difference  
779 was detected.

780 **Fig.4. Fluorescence microscopy analysis of four randomly selected *F. pedrosoi* transformants**  
781 **expressing GFP.** The bright field images are on the left and the green fluorescent on the right. The wild-  
782 type strain was CBS 271.37. Images captured using the Axiovert 100, Carl Zeiss microscope with the  
783 HE 38 filter (green), scale bars are indicated and correspond to 10 µm.

784 **Fig.5. Number of *F. pedrosoi* transformants obtained by *Agrobacterium* mediated transformation.**  
785 (A) Comparison of transformation efficiency per 10<sup>8</sup> *F. pedrosoi* conidia between the plasmids  
786 pAD1625 (Abuodeh et al., 2000) and pPZpFpHPH (this work) after 72h of co-cultivation. The statistical  
787 test applied was One-way ANOVA and Tukey post-test. (B) Evaluation of the factors: time and ratio of  
788 bacterium: fungus for the co-cultivation of 10<sup>6</sup> *F. pedrosoi* conidia and *Agrobacterium* EHA105 using  
789 pAD1625. The statistical test applied was Two-way ANOVA and Tukey post-test. The bars represent

790 the standard error of each group and asterisks indicate *P* values with statistical differences. The bacteria:  
791 fungus ratios for co-cultivation are indicated in the graphs.

792 **Fig.6. Evaluation of *hph* insertion into the genome of the *F. pedrosoi* mutants by Southern**  
793 **Blotting.** 10 µg of genomic DNA were digested with *Bgl*II, and 0.6 kb Digoxigenin-labelled *hph* was  
794 used as probe. The genomic DNA from wild type strain of *F. pedrosoi* CBS 271.37 was used as  
795 untransformed (NT) negative control, while the plasmids pAN7.1, pFpHYG and pZPFpHPH  
796 linearized with *Bgl*II were the positive controls. (A) Biolistic obtained transformants. Lanes 1-4 and  
797 5-8 were bombarded respectively by pAN7.1 and pFpHYG. (B) *Agrobacterium* mediated  
798 transformants using EHA105 carrying pAD1625 (lanes 1-3) and pZPFpHPH (lanes 4-6). The  
799 molecular marker is indicated in the left side of each panel.

800

## 801 Tables

802 Table 1. Number of *F. pedrosoi* transformants obtained by biolistic per µg of DNA  
803 according to the evaluated parameters

Parameters Distance from plate / recovery time in non- selective medium	pFpHYG*		pAN7.1 <sup>‡</sup>	
	Minimum and maximum	Mean	Minimum and maximum	Mean
6 cm/ 24 h	15-130	42	14-80	45
6 cm/ 48 h	6-107	39	6-60	42
9 cm/ 24 h	8-89	35	13-73	26
9 cm/ 48 h	10-103	37	4-40	18

804 \* Calculated from six independent experiments. <sup>‡</sup> Calculated from three independent  
805 experiments

806

807 Table 3: Number of *hygR* mutants obtained by *Agrobacterium* mediated  
808 transformation of 10<sup>8</sup> *F. pedrosoi* conidia after 72 h of co-cultivation

Co – cultivation ratio ( <i>Agrobacterium</i> :conidia)	pAD1625		pPZPFpHPH	
	Minimum and maximum	Mean*	Minimum and maximum	Mean*
1:1	67-200	141	3-81	35
10:1	148-298	209	3-93	54

809 \* Calculated from five independent experiments

810

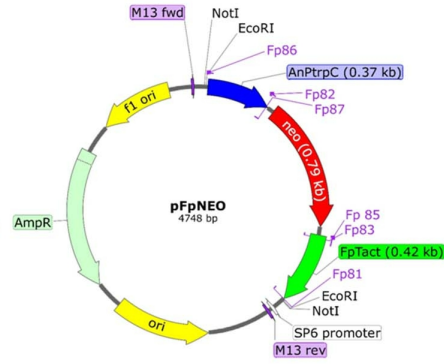
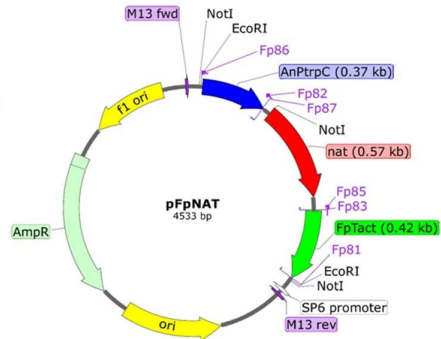
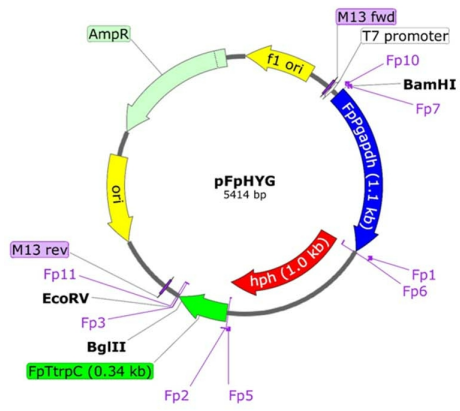
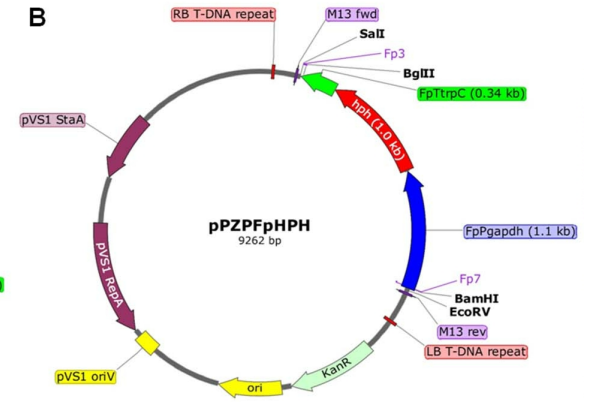
811 Table 4: Number of *hygR* mutants obtained by *Agrobacterium*  
812 mediated transformation of 10<sup>6</sup> *F. pedrosoi* conidia in regard to  
813 co-cultivation parameters

Parameters for co-cultivation Ratio ( <i>Agrobacterium</i> : conidia) / time	pAD1625	
	Minimum and maximum	Mean*
1:1/ 48 h	1-3	1
10:1/ 48 h	13-16	9
100:1/ 48 h	11-82	42
1:1/ 72 h	11-21	10
10:1/ 72 h	23-51	41
100:1/ 72 h	30-64	48

814 \* From three independent experiments

815

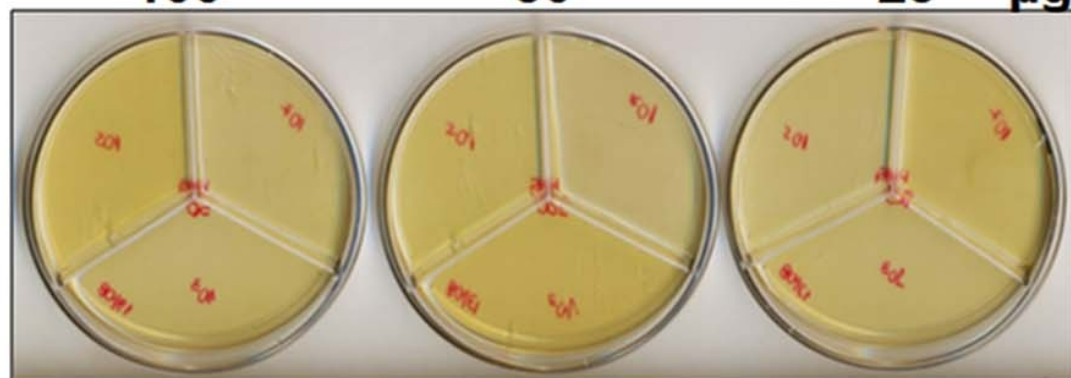
816

**A****B**

100

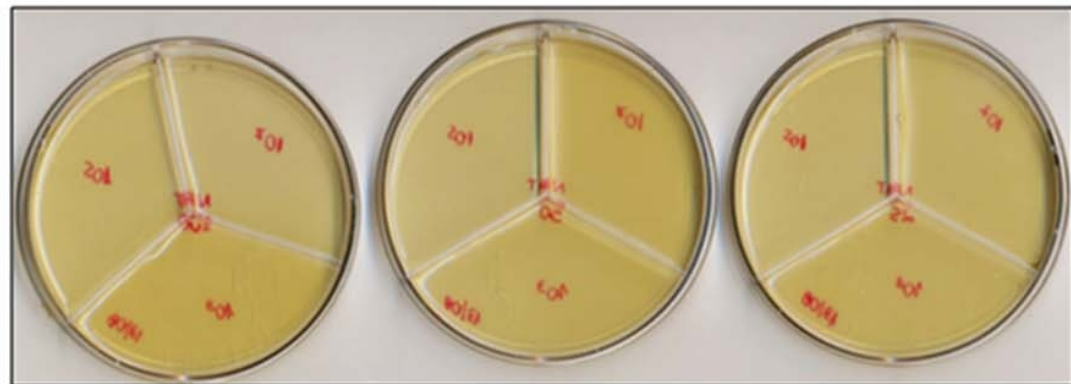
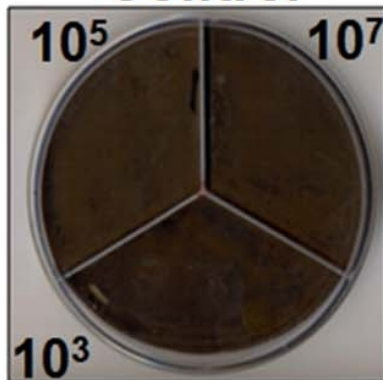
50

25  $\mu\text{g/mL}$

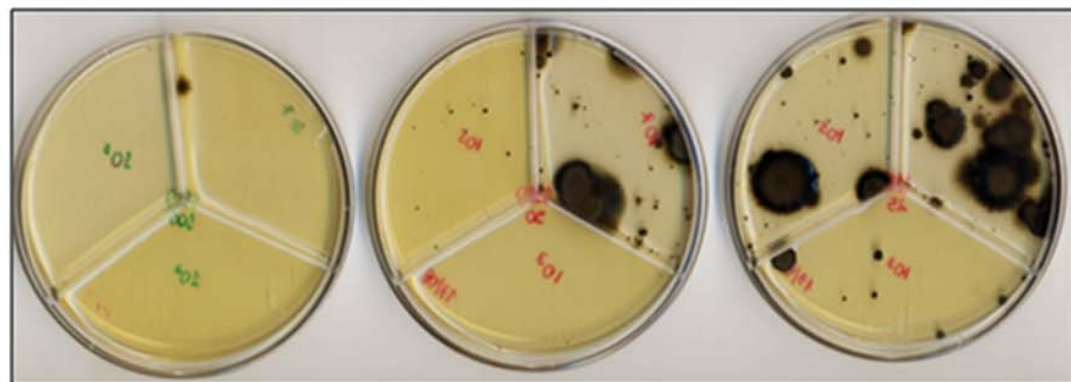


Hygromycin B

Control

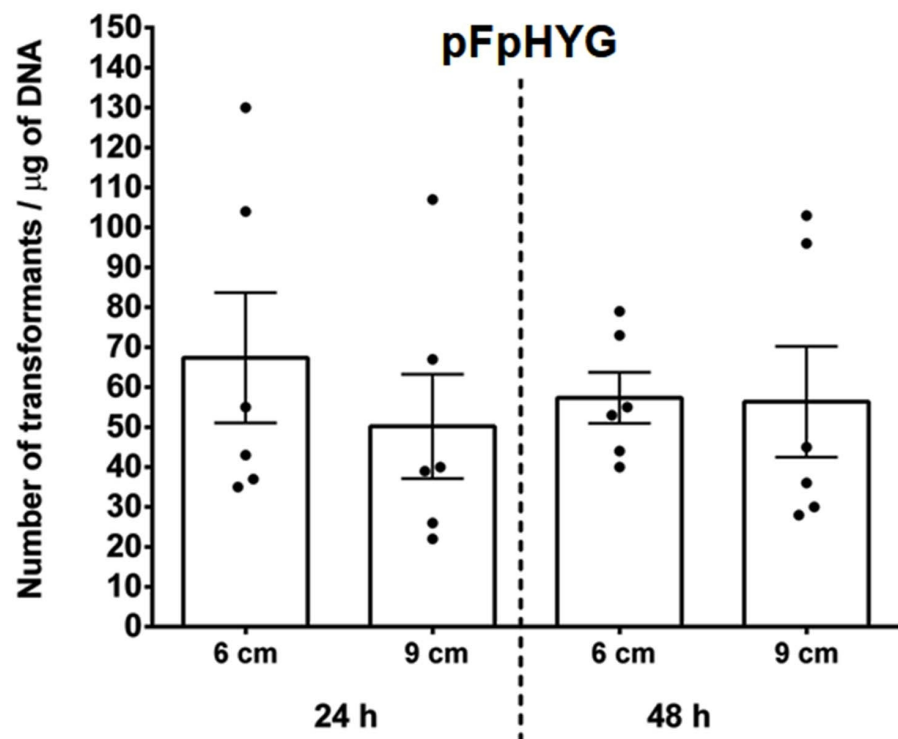
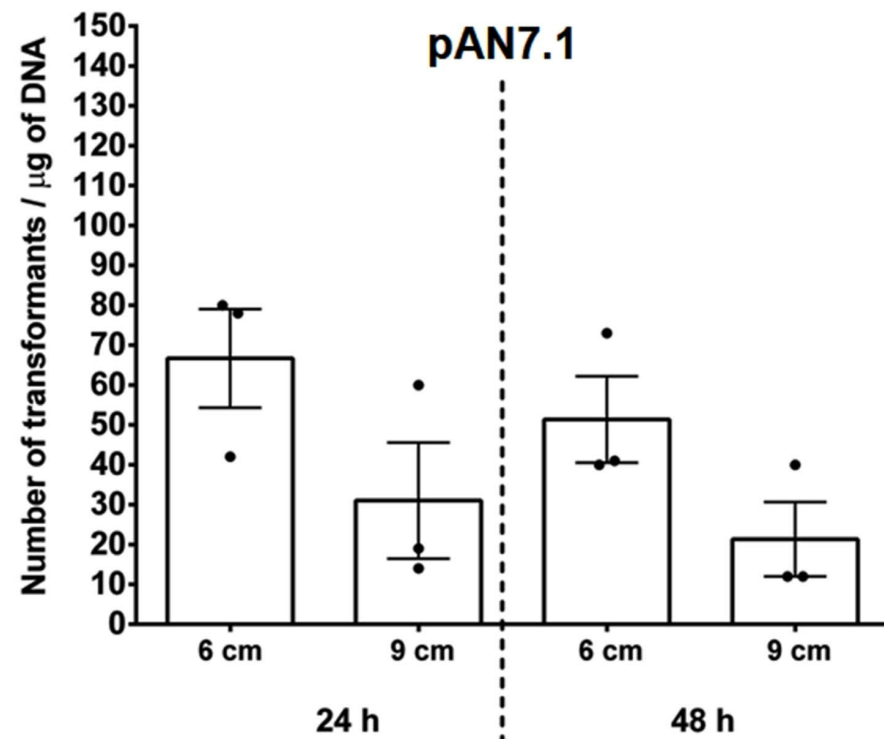


Nourseothricin



Neomycin



**A****B**

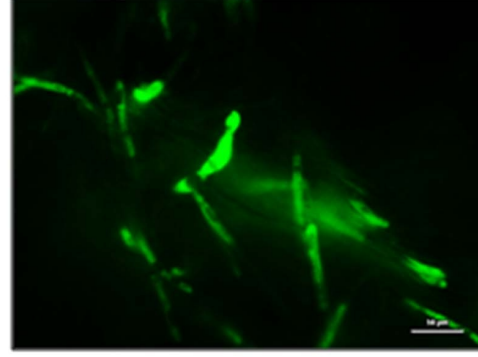
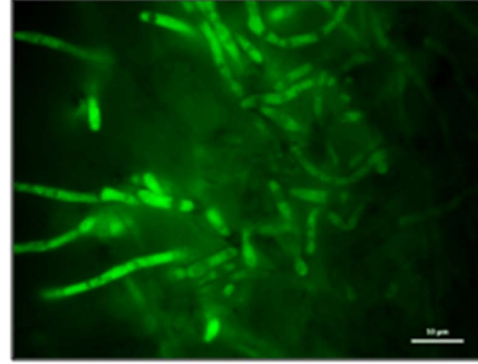
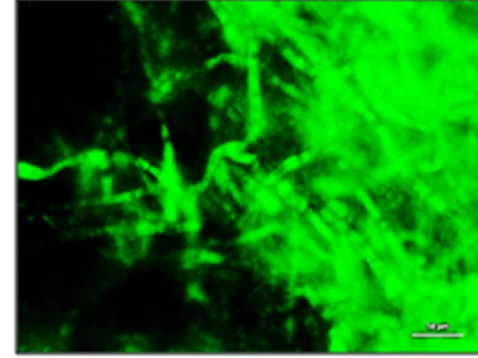
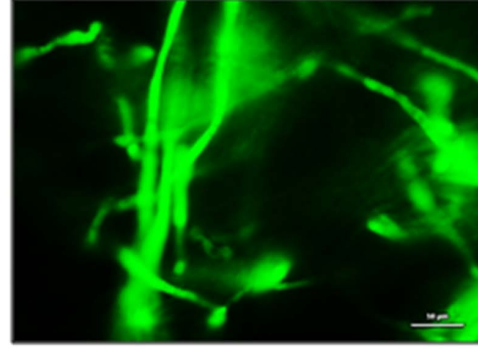
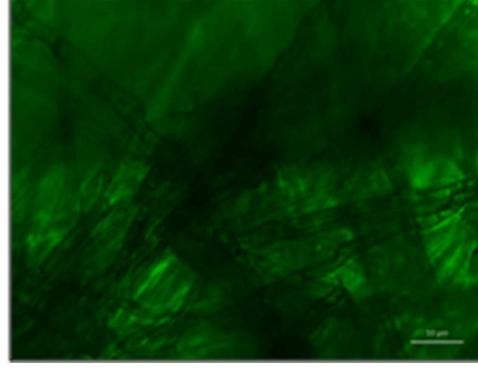
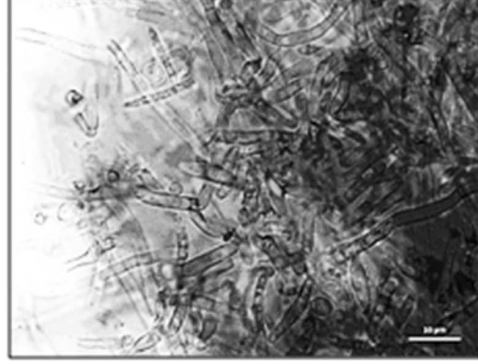
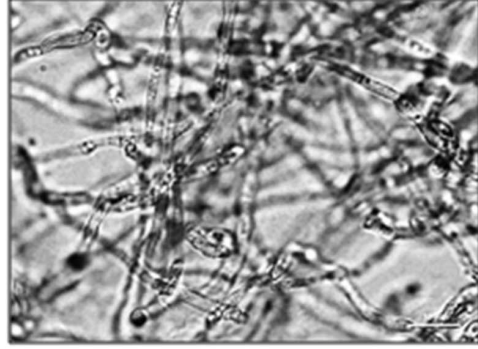
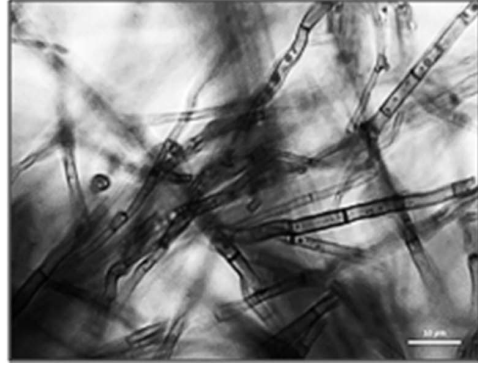
**CBS271.37**

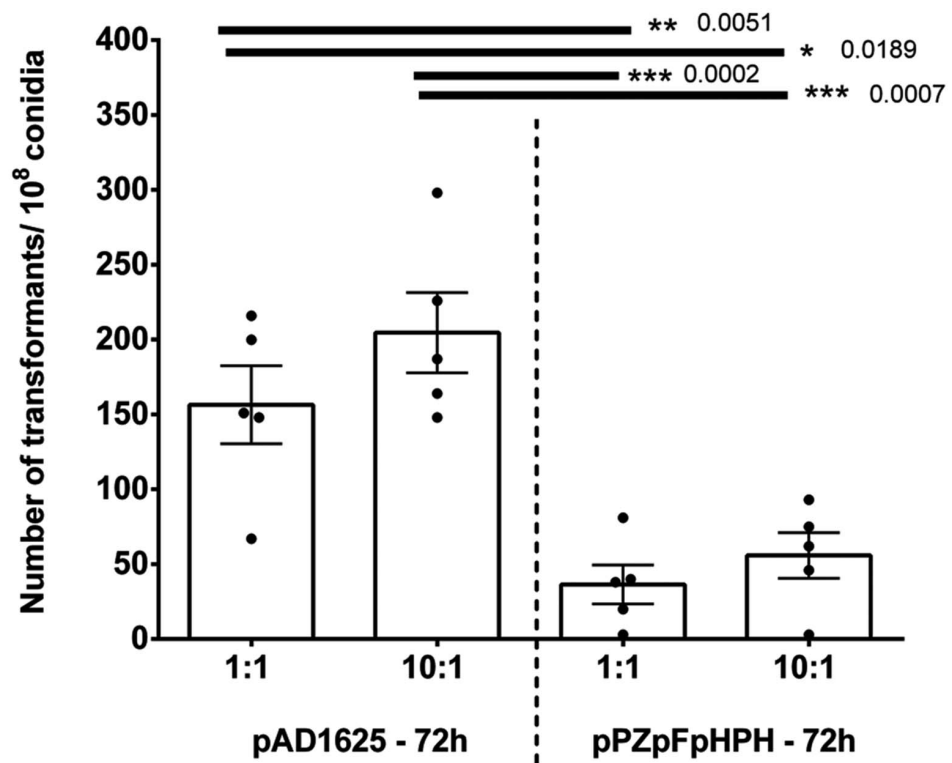
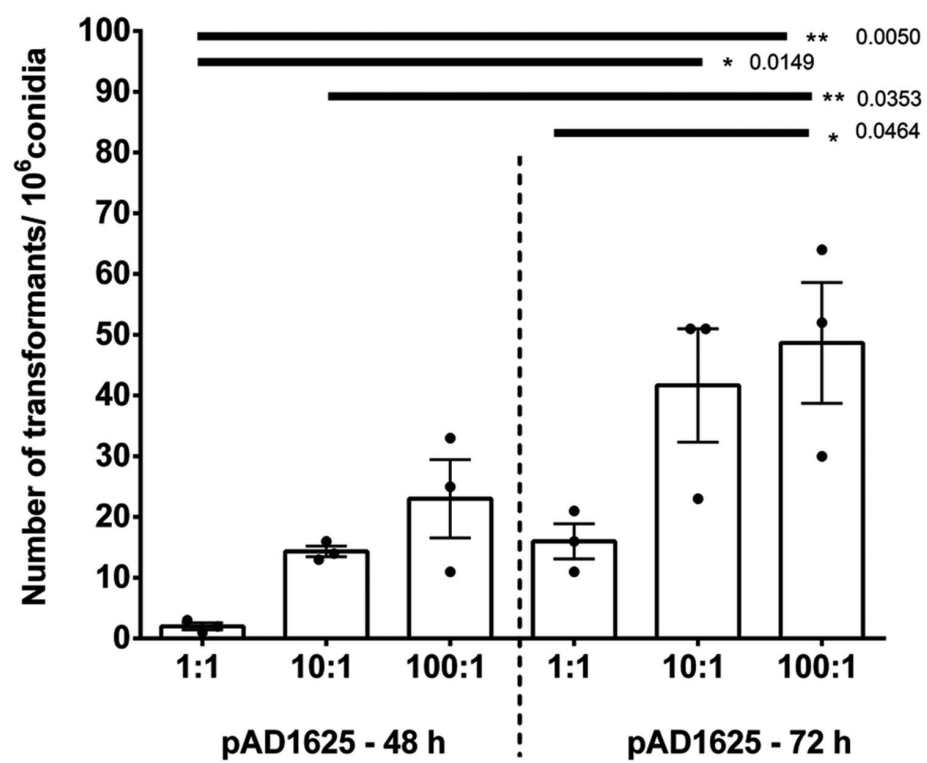
**31.FpgGFP**

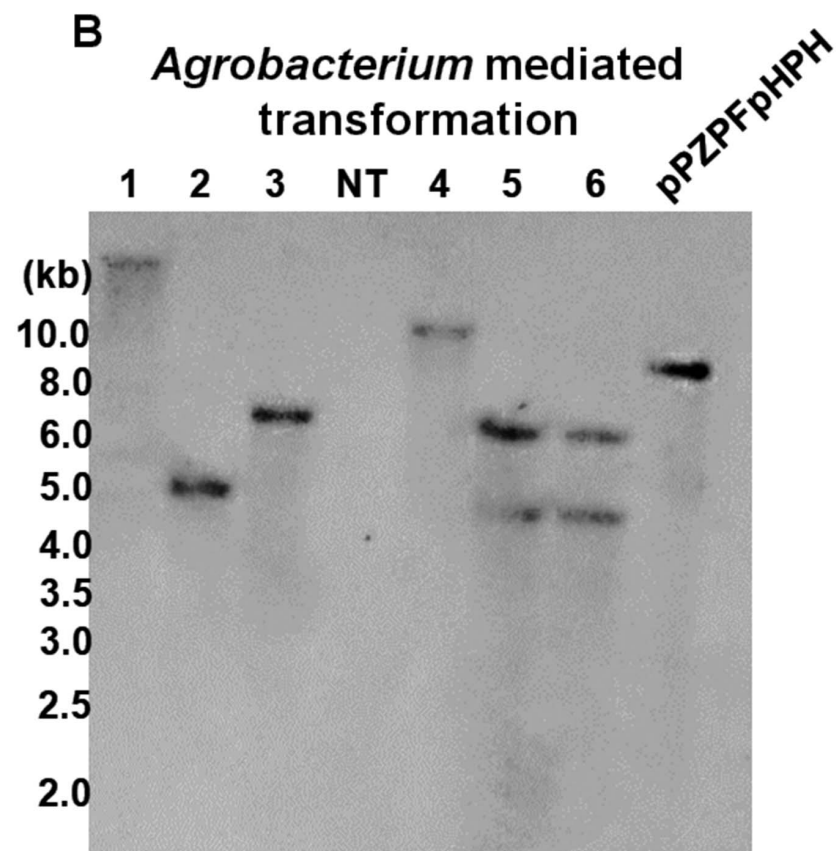
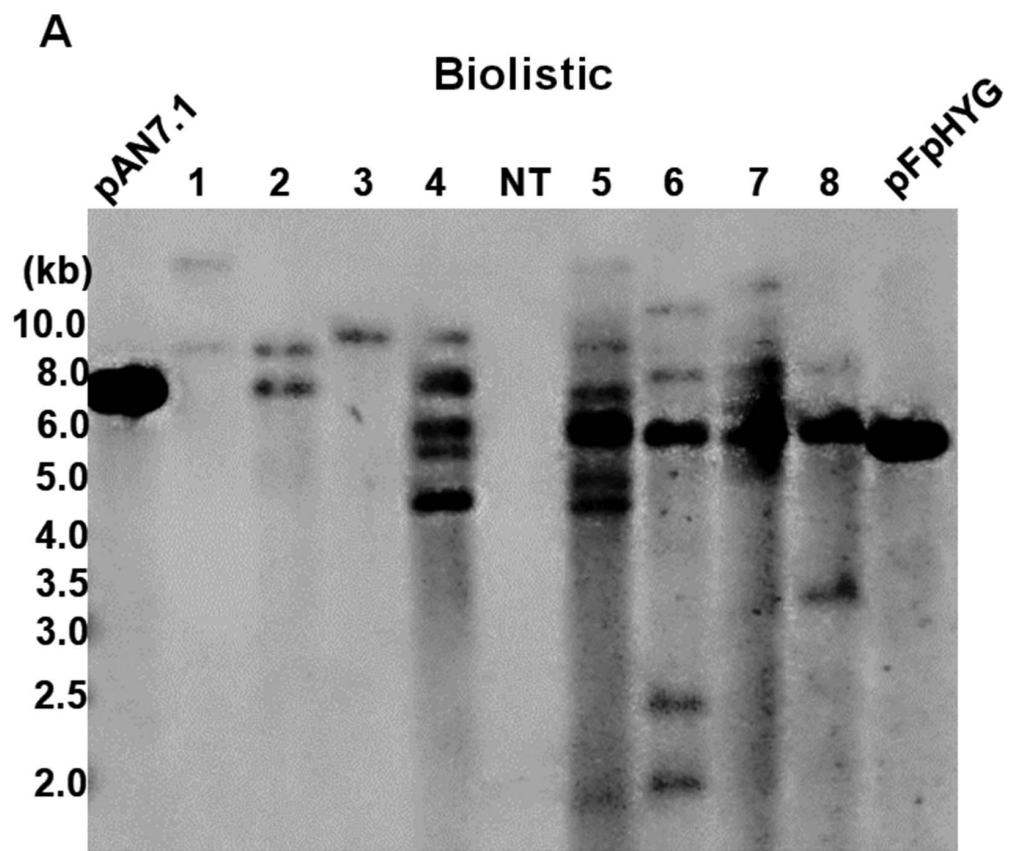
**28.FpgGFP**

**11.FpgGFP**

**3.FpgGFP**



**A****B**



1 **Florencio, CS. Supplementary material**

2

3 **Supl.Table 1. Oligonucleotides used in this work**

Name	Sequence (5'>3')	Target
Fp1	ATGCCTGAACTCACCGCGAC	5' <i>hph</i> ( <i>hygR</i> )
Fp2	CTATTCTTTGCCCTCGGACGA	3' <i>hph</i> ( <i>hygR</i> )
Fp3	AACGAGGCCAAAGAGGATGGATG	3' Terminator <i>FpTrpC</i>
Fp5	TCGTCCGAGGGCAAAGAATAGATACCAGACCAGACACCTTG	5' Terminator <i>FpTrpC</i>
Fp 6	GTCGCGGTGAGTTCAGGCATGGTCTCGTCAAGATGTGAAGA	3' Promoter <i>FpPgapdh</i>
Fp7	GTCGTATCAGTCTTGAGTCGGATA	5' Promoter <i>FpPgapdh</i>
Fp10	AGAACTAGTGGATCCGTCGTATTCAGTCTTGAGTCGGATA	5' Cassette <i>FpPgapdh::hph::FpTrpC</i>
Fp11	GATAAGCTTGATATCAACGAGGCCAAAGAGGATGATG	3' Cassette <i>FpPgapdh::hph::FpTrpC</i>
Fp81	CAAAAGCTGGGTACCTCCACTGGATGACTACTGGTCC	3' Terminator <i>FpTact</i>
Fp82	CGTCTCCTAATATGCAGCCTCT	5' neoR/natR
Fp83	GCCCAGATTGCATCACTTCT	3' neoR/natR
Fp85	AGAAGTGATGCAATCTGGGCACACTCTTTGAGCATCGGGTA	5' Terminator <i>FpTact</i>
Fp86	GCCTCTGCAGGTCGACCGCGACGTAACTGATATTG	5' Promoter <i>AnTrpC</i>
Fp87	AGAGGCTGCCATATTAGGAGACGCGATGCTTGGGTAGAATAGG	3' Promoter <i>AnTrpC</i>
LF08	GATGTTGGCGACCTCGTATT	5' <i>hph</i> probe
LF29	AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT	3' <i>hph</i> probe

4 *hph*: Hygromycin phosphotransferase (confers resistance to Hygromycin B – HygR); Fp: *Fonsecaea pedrosoi*; An:  
5 *Aspergillus nidulans*; *trpC*: Tryptophan biosynthesis protein, *gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;  
6 *act*: actin; P: promoter; T: terminator.

7

8

9

10

11

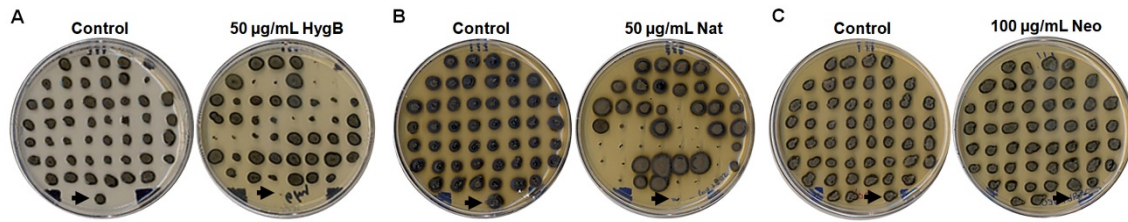
12

13

14

15 **Fig. Supl. 1**

16



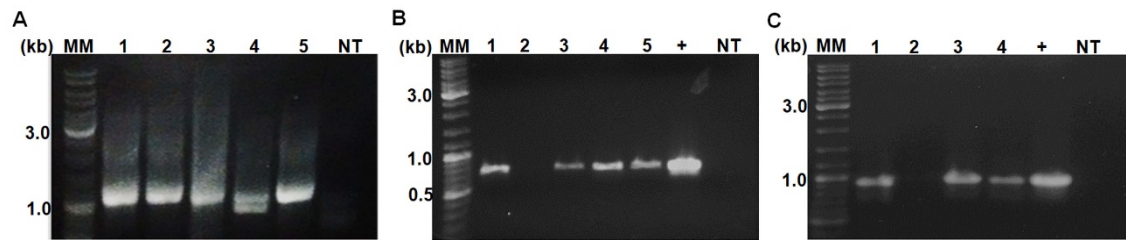
17

18 **Fig. Supl. 1. *F. pedrosoi* transformants obtained by particle bombardment carrying**  
19 **plasmids: (A) pFpHYG; (B) pFpNAT and (C) pFpNEO after the third passage in**  
20 **the selective and nonselective medium for mitotic stability evaluation. The control**  
21 **was SDA. The plates were incubated at 25°C for 10 days. The arrows indicate**  
22 **untransformed *F. pedrosoi* (strain CBS 271.37). The Hygromycin B, Nourseothricin and**  
23 **Neomycin concentrations are indicated on the top of the plates.**

24

25 **Fig. Supl. 2**

26



27

28

29 **Fig. Supl. 2. Amplification of the foreign DNA fragments related to *hygR*, *natR* and**  
30 ***neoR* in randomly selected *F. pedrosoi* transformants bombarded with pFpHYG (A),**  
31 **pFpNAT (B) and pFpNEO (C). Oligonucleotides Fp1 and Fp2 were used to PCR**  
32 **amplification of 1.0 kb related to *hph*, Fp82 and Fp83 were used for *nat* (0.7 kb) and *neo***  
33 **(0.9 kb). NT corresponds to the untransformed *F. pedrosoi* strain CBS 271.37; intact**  
34 **plasmids were templates for positive controls. MM: Molecular Marker (1 kb GeneRuler**  
35 **DNA Ladder Mix, Thermo).**

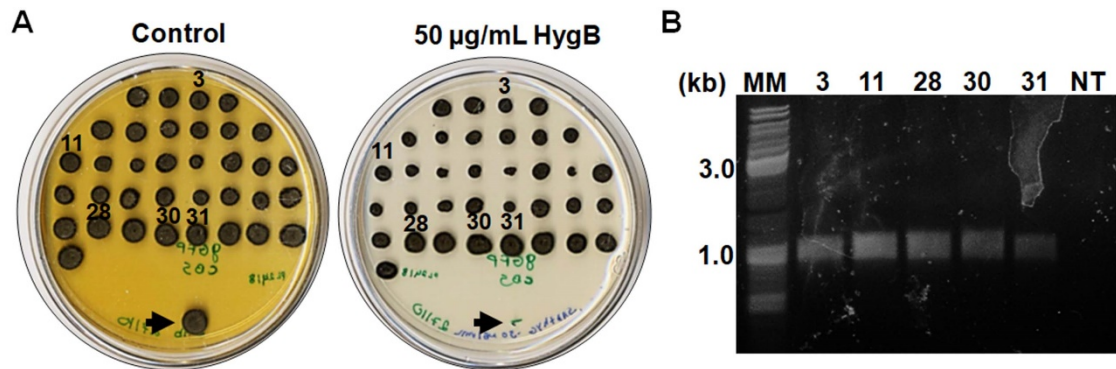
36

37



38 **Fig. Supl. 3**

39



40

41 **Fig. Supl. 3. *F. pedrosoi* GFP transformants after biolistic of the gGFP vector. (A)**

42 *F. pedrosoi* mutants after the third passage in the selective (SDA supplemented 50 µg/mL

43 of Hygromycin B) and nonselective medium (SDA). The plates were incubated at 25°C

44 for 10 days for mitotic stability analysis. The arrows indicate untransformed *F. pedrosoi*

45 strain CBS 271.37. (B) Amplification of *hph* in randomly selected *F. pedrosoi*

46 transformants: 3, 11, 28, 30 and 31 bombarded with gGFP with oligonucleotides Fp1 and

47 Fp2 (1.0 kb). The transformant number 30 presented the fragment related to *hph*, however

48 did not express GFP after fluorescence microscopy inspection. NT corresponds to the

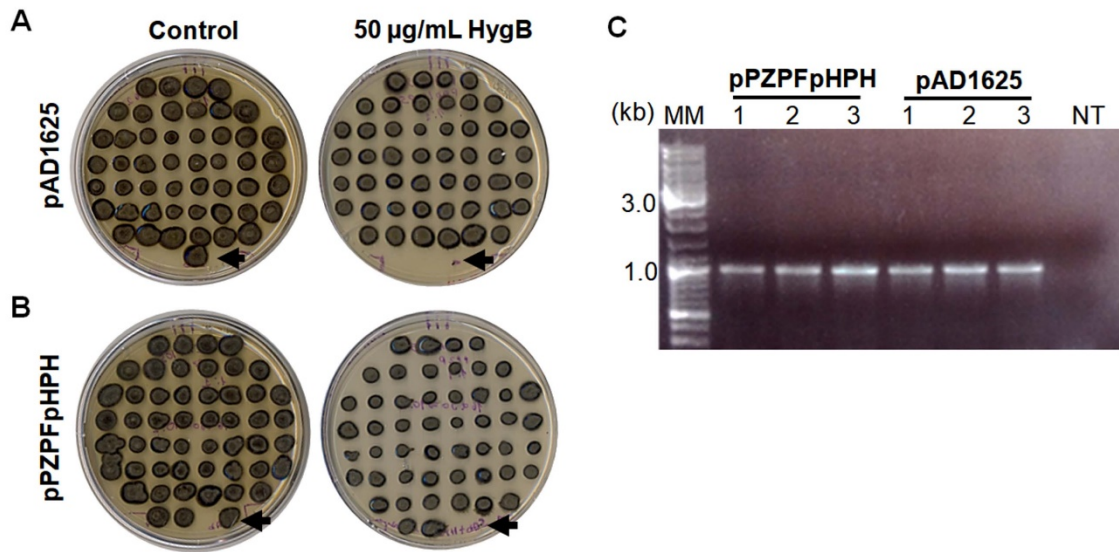
49 untransformed *F. pedrosoi* strain CBS 271.37. MM: Molecular Marker (1 kb GeneRuler

50 DNA Ladder Mix, Thermo).

51



52 Fig. Supl. 4



53

54 Fig. Supl. 4. *F. pedrosoi* transformants resistant to Hygromycin B obtained by  
55 ATMT with EHA105 containing pZPFPpHPH (this work) and pAD1625 (Abuodeh  
56 et al., 2000). (A) *F. pedrosoi* mutants after the third passage in the selective (SDA  
57 supplemented with 50 µg/mL of Hygromycin B) and nonselective medium (SDA). The  
58 plates were incubated at 25 °C for 10 days for mitotic stability analysis. The arrows  
59 indicate untransformed *F. pedrosoi* strain CBS 271.37. (B) Amplification of *hph* of six  
60 randomly selected *F. pedrosoi* transformants (3, 11, 28, 30 and 31) bombarded with  
61 gGFP, with oligonucleotides Fp1 and Fp2 (1.0 kb). NT corresponds to the untransformed  
62 *F. pedrosoi* strain CBS 271.37. MM: Molecular Marker (1 kb GeneRuler DNA Ladder  
63 Mix, Thermo).

64

[Home](#)   [Reports](#)

Due to maintenance, EVISE will be unavailable on Thursday September 21 between 7:30 and 10:30 am BST. Due to maintenance, the reports in EVISE will not be available on Saturday September 16 between 10:00 and 15:00 BST.



MICRES\_2017\_783 | Research Paper

## Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium* mediated transformation

Larissa Fernandes Matos

University of Brasilia, Faculdade de Ceilândia, Campus Darcy Ribeiro Instituto de Biologia, Bloco J, 2° pavimento. Laboratório de Imunologia Aplicada Departamento de Biologia Celular Universidade de Brasília Asa Norte , Brazil.



Zip File

Status: **No Editor Invited (0 days)** | Submitted: **14/Sep/2017**[Overview](#)

Files



Messages

**Other Authors** [Show Details](#)

Camille Silva Florencio (Universidade de Brasília), Fabiana Alves Silva Brandão (Universidade de Brasília), Marcus de Mello Teixeira (Northern Arizona University), Anamélia Lorenzetti Bocca (Universidade de Brasília), Maria Sueli Soares Felipe (Universidade Católica de Brasília), Vania Vicente (Universidade Federal do Paraná)

**Contact Editorial Team**

### Abstract

*Fonsecaea pedrosoi*, a melanized fungal pathogen that causes Chromoblastomycosis, a human disease with a worldwide distribution. Biolistic is a widely used technique for direct delivery of genetic material into intact cells by particles bombardment. Another well-established transformation method is *Agrobacterium*-mediated transformation (ATMT), which involves the transfer of a T-DNA from the bacterium to the target cells. In *F. pedrosoi* there are no reports of established protocols for genetic transformation, which require optimization of physical and biological parameters. In this work, intact conidia of *F. pedrosoi* were particle bombarded and subjected to ATMT. In addition, we proposed Hygromycin B, Nourseothricin and Neomycin as dominant selective markers for *F. pedrosoi* and vectors were constructed. We tested two parameters for biolistic: the distance of the particles to the target cells and time of cells recovery in nonselective medium. The biolistic efficiency was 37 transformants/  $\mu\text{g}$  of pFpHYG, and 45 transformants/  $\mu\text{g}$  of pAN7.1. Transformants expressing GFP were successfully obtained by biolistic. A co-culture ratio of 10: 1 (bacterium: conidia) and co-incubation time of 72 hours yielded the largest number of transformants after ATMT. Southern blot analysis showed the number of foreign DNA insertion into the genome is dependent upon the plasmid used to generate the mutants. This work describes for the first time two efficient methods for genetically modify *Fonsecaea* and these results open new avenues to better understand the biology and pathogenicity of the main causal agent of this neglected disease.

### Keywords

*Fonsecaea*; genetic transformation; biolistic; *Agrobacterium*-mediated transformation.

### Research Data

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:

Data will be made available on request

### Additional Information

Hide

Suggested Reviewers



### TABLE OF CONTENTS

---

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0944-5013

### DESCRIPTION

---

*Microbiological Research* is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea, and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate a significant contribution of broad interest. Papers of rather specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered. Studies in the following sections are included:

Reviews/Minireviews on all aspects Microbiology and Genetics Molecular and Cell Biology Metabolism and Physiology Signal transduction and Development Biotechnology Phytopathology Environmental Microbiology and Ecology

### AUDIENCE

---

Microbiologists, biotechnologists, phytopathologists, researchers in molecular biology, researchers in agricultural and environmental sciences, biochemists, cellbiologists, biotechnologists, geneticists, ecologists, forest scientists, limnologists, agriculturists, specialists in plant cultivation

### IMPACT FACTOR

---

2016: 3.037 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS  
Chemical Abstracts  
Chemical Engineering and Biochemical Abstracts (CEBA)  
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
MEDLINE®  
Field Crop Abstracts  
Horticultural Abstracts  
Research Alert  
Review of Medical and Veterinary Mycology  
Science Citation Index  
Scisearch  
Soils and Fertilizers  
CAB Abstracts  
Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences  
Scopus  
Science Citation Index Expanded  
Current Advances in Genetics and Molecular Biology  
Current Advances in Protein Biochemistry  
Engineering Information Compendex  
GEO  
NISC - National Information Services Corporation  
Weed Abstracts

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Jürgen Wendland**, Research Group of Microbiology (MICR), Vrije Universiteit Brussel (VUB), Pleinlaan 2, B-1050, Brussels, Belgium

### *Senior Editors*

**Gurusamy Annadurai**, Environmental Nanobiotechnology and Nanobioinformatics Division, Sriparmakalyani Centre for Environmental Sciences, Manonmaniam Sundaranar University, Alwarkurichi - 627 412. Tirunelveli, TN, India

**Zhanbei (John) Liang**, Ground Water Ecosystems Restoration Division National Risk Management Research Laboratory U.S. Envir, NRC Research associate, 919 Kerr Lab Road, Ada, Oklahoma, OK, 74820, USA

**Malcolm Whiteway**, Biotechnology Research Inst., Conseil national de recherches Canada (CNRC), 6100 Royalmount avenue, Montreal, H4P 2R2, Quebec, Canada

**Xue-Song Zhang**, School of Medicine, New York University, 423 East 23rd Street, Room 6026W, New York, New York, NY 10010, USA

**Xiaohui Zhou**, Department of Pathobiology & Veterinary Science, University of Connecticut, 61 N. Eagleville Rd, Storrs, Connecticut, 06269, USA

### *Review Editor*

**Xiaohui Zhou**, Department of Pathobiology & Veterinary Science, University of Connecticut, 61 N. Eagleville Rd, Storrs, Connecticut, 06269, USA

### *Editorial Board*

**Shah Ali-Ul-Qader**, University of Karachi, Karachi, Pakistan

**Marcela Carina Audisio**, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

**Bhaskar Bhadra**, Reliance Industries Ltd., Mumbai, India

**Karin D Breunig**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

**Keya Chaudhuri**, Indian Institute of Chemical Biology, Kolkata, India

**Shi Chen**, Wuhan University, Wuhan, China

**Thamy Livia Ribeiro Correa**, Campinas, Brazil

**Daniele Daffonchio**, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

**Gabriele Diekert**, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

**H. Benan Dincturk Botofte**, Sakarya University, Sakarya, Turkey

**Susanne Fetzner**, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, Germany

**Haifeng Geng**, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

**Scott Gold**, University of Georgia, Athens, Georgia, USA

**Uwe Horn**, Leibnitz Institute for Natural Product Research, Jena, Germany

**En Huang**, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA  
**Mohamed Jebbar**, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France  
**Linghuo Jiang**, Jiangnan University, Wuxi, China  
**Mohan Chandra Joshi**, Center for DNA Fingerprt. & Diagn., Hyderabad, India  
**Fu-Cheng Lin**, Zhejiang University, Hangzhou, China  
**Wei Lin**, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China  
**Wenjium Liu**, Ministry of Education, Huhhot, Inner Mongolia, China  
**Marina Nadel**, University of Cambridge, Cambridge, England, UK  
**Bernard Paul**, Université de Bourgogne, Dijon, France  
**Gerardo Puopolo**, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Italy  
**Mingsheng Qi**, Iowa State University, Ames, Iowa, USA  
**Tanvir Rahman**, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, Bangladesh  
**Peter Schönheit**, University of Kiel, Kiel, Germany  
**Christoph Schüller**, Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Tulln, Austria  
**Haoyu Si**, University of Maryland, Baltimore County (UMBC), Baltimore, Maryland, USA  
**Giuseppe Spano**, University of Foggia, Foggia, Italy  
**Dave Speijer**, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands  
**Palanivel Velmurugan**, Chonbuk National University, Jeonbuk, The Republic of Korea  
**Jürgen Voigt**, Charité Humboldt-Universität Berlin, Berlin, Germany  
**Christine R Voisey**, AgResearch, Palmerston North, New Zealand  
**Qiyao Wang**, East China University of Science and Technology, Shanghai, China

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

*Microbiological Research* is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea, and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate a significant contribution of broad interest. Papers of very specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered.

Studies in the following sections are included:

- Reviews/Minireviews on all aspects
- Microbiology and Genetics
- Molecular and Cell Biology
- Metabolism and Physiology
- Signal transduction and Development
- Biotechnology
- Phytopathology
- Environmental Microbiology and Ecology

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.



### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 1800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.



Submit your article

Please submit your article via [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=MICRES](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MICRES).

#### *Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Number pages and lines consecutively throughout the manuscript.

### **Article structure**

#### *Subdivision - unnumbered sections*

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### *Units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

#### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

**information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

For supported file types in Evise, please visit our [Support site for Evise](#). Note: The list will be expanded as more file types are supported.

#### *Illustration services*

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/microbiological-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### Reference style

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead



of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **RESEARCH DATA**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals](#) page.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### *Availability of accepted article*

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

#### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

## **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

## **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

## Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	BIODIVERSIDADE	B1
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	BIOTECNOLOGIA	B1
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	CIÊNCIA DE ALIMENTOS	B2
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	CIÊNCIAS AGRÁRIAS I	B1
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	CIÊNCIAS AMBIENTAIS	A2
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I	B1
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II	B1
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III	B1
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	ENGENHARIAS I	A2
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	FARMÁCIA	B1
0944-5013	MICROBIOLOGICAL RESEARCH (PRINT)	INTERDISCIPLINAR	A2