

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

**Análise funcional do gene *chit1* do fungo entomopatogênico
*Metarhizium anisopliae***

Dissertação de Mestrado

TATIANA SOARES FERREIRA DE SOUZA

Porto Alegre, 2007.

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

**Análise funcional do gene *chit1* do fungo entomopatogênico *Metarhizium
anisopliae***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

TATIANA SOARES FERREIRA DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Co-orientadora: Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2007.

Este trabalho foi inteiramente realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os recursos financeiros para financiamento do projeto foram oriundos da FAPERGS, CNPq e CAPES.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Augusto Schrank e á Professora Dr^a. Marilene H. Vainstein meu reconhecimento e gratidão pela paciência, compreensão, oportunidades e orientação e co-orientação.

Aos professores Prof. Dr. Giancarlo Pasquali e a Prof^a Dr^a. Irene Schrank, membros da comissão de acompanhamento.

Á relatora da dissertação, Professora Irene Silveira Schrank, pelas valiosas sugestões desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realização desse curso.

Aos colegas dos Laboratórios 217 e 220: Ângela, Bianca Bittencourt, Charley Staats, Carolina Silveira, Felipe Zambelli, Irina Lubeck, Josiane Faganello, Juliana, Juliano Boldo, Leonardo Broetto, Lis, Lívia Silva, Roberta Bussamara, Lucélia Santi pela convivência e amizade.

Ás minhas queridas amigas, Cristine, Lenise, e Márcia pela amizade, paciência e pelo incessante e persistente incentivo, que tantas vezes precisei.

A todos os professores, funcionários e a todas as pessoas que direta e indiretamente colaboraram e contribuíram para a realização desta dissertação, dando-me força e incentivo.

Ao meu namorado, Adriano um agradecimento especial, por seu amor, carinho, compreensão, paciência e pelo apoio incondicional por estar comigo em todos os momentos em que mais precisei durante a elaboração desta dissertação, que me ajudou a manter a tranqüilidade durante esses dois anos de pós-graduação. Aos meus sogros, pelo carinho e incentivo.

E meu maior agradecimento é dirigido a meus pais, Carlos e Ester, que com muito carinho, atenção e amor, sempre me apoiaram e incentivaram em cada etapa da minha vida, me ajudando a evoluir nos estudos e na vida. Agradeço por todo esforço, dedicação, carinho, pela confiança que depositaram em mim, e pela

minha ausência. Sem a ajuda de vocês não seria possível finalizar esta dissertação. Ao meu irmão pelo carinho e amizade sincera.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ÍNDICE	6
LISTAS DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O fungo filamentoso <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
1.2 O processo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
1.3 Quitina e quitinases	20
1.4 Quitinases em <i>M. anisopliae</i>	24
1.5 Genes de quitinases isolados de <i>Metarhizium</i>	25
1.6 Gene <i>chit1</i> e sua superexpressão	26
2 – OBJETIVOS	28
2.1 – Objetivo geral	28
2.2 - Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Microrganismos	29
3.1.1- Linhagem de <i>M. anisopliae</i>	29
3.1.2 - Transformantes de <i>M. anisopliae</i>	29
3.1.3 - Manutenção e cultivo dos microrganismos	31
3.1.4 - Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i>	31
3.1.5 - Cultivo de <i>M. anisopliae</i> e das linhagens transformantes em diferentes fontes de carbono	32
3.1.5.1 - Preparação de cutículas	32
3.2 - Ensaio enzimáticos	33
3.2.1 - Quantificação de proteínas	33
3.2.2 - Ensaio enzimático para a detecção de quitinase	33
3.2.3 - Quantificação de açúcar redutor	34
3.3 - Eletroforese	34

3.3.1 - SDS-PAGE	34
3.3.2 - Gel para detecção de atividade quitinolítica em SDS-PAGE.....	35
3.4 - Bioensaios – infecção de carrapatos	35
3.5 - Manipulação de ácidos nucléicos	36
3.5.1 - Extração de DNA genômico de <i>M. anisopliae</i>	36
3.5.2 - Extração de RNA de <i>M. anisopliae</i>	37
3.5.3 - Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	37
3.5.4 - Tratamento de RNA com enzima Dnase I.....	38
3.5.5 - Amplificação por RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction).....	38
3.5.6 - Amplificação de DNA pela técnica de PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	39
Componentes	39
3.5.6.1 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #PANDOWN e #PANUP	40
3.5.6.2 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tef1F e #Chit1R; #tef1F e #Chit1F	40
3.5.6.3 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #chit1R e #chit1F	40
3.5.6.4 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tef1F e #tef1R	40
3.5.6.5 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tubF e #tubR	40
3.5.6.6 Oligonucleotídeos.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1 - Análise das construções com o gene <i>chit1</i> de <i>M. anisopliae</i>	42
4.2 - Produção de proteínas durante o cultivo de <i>M. anisopliae</i> transformantes em meio adicionado em diferentes fontes de carbono	46
4.3 - Determinação da atividade quitinolítica nos transformantes que superexpressam o gene <i>chit1</i> em cultivos com diferentes fontes de carbono ...	51

4.4 - Bioensaios: efeitos da superexpressão do gene <i>chit1</i> no processo de infecção do carrapato <i>Boophilus microplus</i>	55
4.5 - Análise do padrão de expressão do gene <i>chit1</i> em cultivos de <i>M. anisopliae</i> nos tempos de incubação de 48, 72 e 96 horas em glicose 1%.....	57
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTAS DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Célsius
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Deoxirribonucleosídeo(s) trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNS	Ácido 3,5 - dinitrossalicílico
DTX	Destruxina
EDTA	Sal dissódico do ácido etilendiaminotetraacético
g	Grama, aceleração da gravidade
h	Hora
kDa	Quilidaltos
L	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MCC	Meio de Cove completo
MC	Meio de Cove
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
GlcNac	N-acetil-D-glicosamina
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
p/V	Peso por volume

rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SDS	Lauril sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TE	Tampão Tris-HCl / EDTA
Tris	2 - amino - 2 - hidroximetilpropano - 1,3 - diol
Tween	Polisorbitano
UV	Radiação ultravioleta
V	Voltz
v/V	Volume por volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas do processo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Boophilus microplus</i> (ARRUDA <i>et al.</i> , 2005).	19
Figura 2 - Estrutura química da quitina	21
Figura 3 - Representação esquemática dos mecanismos de ação das quitinases	23
Figura 4 - Mapa físico dos plasmídeos pTEFCHIT1 (A) e pCHIT1ANTI (B)	30
Figura 5 - Confirmação da presença do gene <i>bar</i> nas construções.....	43
Figura 6 - Análise de transformantes resistentes ao glifosinato quanto à presença do promotor <i>ptefa</i>	45
Figura 7 - Análise de transformantes resistentes ao glifosinato quanto à presença do cDNA do gene <i>chit1</i>	46
Figura 8 - Secreção de proteínas totais em cultivos de <i>M. anisopliae</i> e transformantes em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos	48
Figura 9 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% das proteínas presentes no sobrenadante de cultivos em diferentes tempos	50
Figura 10 - Atividade específica de quitinases em sobrenadantes de cultivos de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos	53
Figura 11 - Determinação de açúcares redutores em cultivos de <i>M. anisopliae</i> em culturas com glicose 1%.	55
Figura 12 - Patogenicidade de <i>M. anisopliae</i> e dos transformantes que superexpressam o gene <i>chit1</i> em teleóginas de <i>Boophilus microplus</i>	56
Figura 13 - Análise de transformantes resistentes ao glifosinato de amônio quanto à presença do cDNA do gene <i>chit1</i> reisolados de <i>Boophilus microplus</i>	57
Figura 14 - Nível de transcritos do gene <i>chit1</i> de <i>M. anisopliae</i> em cultivos com glicose 1% incubados por 48, 72 e 96 horas.....	59
Figura 15 - Morfologia da colônia, das hifas e dos conídios de <i>M. anisopliae</i> e os transformantes que superexpressam o gene <i>chit1</i> em meio Mc.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes das reações de amplificação de DNA por PCR.....	39
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados.....	41
Tabela 3 - Atividade de quitinase de <i>M. anisopliae</i> selvagem (E6S2) e dos transformantes superexpressando o gene <i>chit1</i> em cutícula 1% em diferentes tempos de cultivo.....	54
Tabela 4- Atividade de quitinase de <i>M. anisopliae</i> selvagem (E6S2) e dos transformantes superexpressando o gene <i>chit1</i> em quitina cristalina 1% em diferentes fontes de carbono.....	54
Tabela 5- Atividade de quitinase de <i>M. anisopliae</i> selvagem (E6S2) e dos transformantes superexpressando o gene <i>chit1</i> em glicose 1% em diferentes fontes de carbono.....	54

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico que infecta uma variedade de artrópodes. É o entomopatógeno melhor caracterizado, tendo a capacidade de penetrar ativamente através da cutícula de seus hospedeiros. Durante a infecção, *Metarhizium* produz hidrolases, como proteases, lipases e quitinases que auxiliam na penetração da cutícula de seus hospedeiros e também estão relacionadas ao processo de colonização. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de genes que atuam na etapa de penetração dos hospedeiros, em especial, caracterizando o sistema de degradação da quitina em *M. anisopliae*. Três genes que codificam quitinases já foram caracterizados em *M. anisopliae*: o gene *chit1*, que codifica uma endoquitinase de 42 kDa (BOGO, 1998), o gene *chi2* que codifica uma quitinase de 42 kDa e o gene *chi3* que codifica uma endo/exo quitinase de 30 kDa (SILVA et al., 2005). Entretanto, apenas a quitinase de 30 kDa foi demonstrada ser produzida durante o processo de penetração. A função dos outros dois genes não foi ainda determinada.

O objetivo deste trabalho foi estudar a função do gene *chit1* em *M. anisopliae* por meio da superexpressão da endoquitinase de 42 KDa. Neste, e em trabalhos anteriores do grupo, o gene *chit1* foi clonado e caracterizado e sua ORF foi clonada em um vetor de expressão baseado no promotor homólogo do gene *tef1- α* (*ptef1- α* , NAKAZATO et al., 2006). Em outra construção a ORF *chit1* foi clonada na orientação anti-senso no mesmo vetor de expressão. Neste trabalho, a superexpressão, bem como a supressão da expressão pelo anti-senso, foram analisadas em relação à produção da endoquitinase de 42 KDa e as linhagens construídas foram testadas em bioensaios utilizando o carrapato *B. microplus*, para se verificar sua participação no processo de infecção de carrapatos. Possíveis alterações morfológicas no ciclo normal de desenvolvimento também foram analisadas. Os resultados mostram um aumento na expressão da endoquitinase na construção de superexpressão em relação à linhagem selvagem de *M. anisopliae*. Em experimentos de bioensaio com carrapatos (*Boophilus microplus*) não foram observadas diferenças na eficiência de infecção da linhagem

do fungo que superexpressa o gene *chit1* nem daquela contendo a construção antisense, havendo 100% de mortalidade no terceiro dia após a infecção, comparável com a linhagem selvagem. Também não foram detectadas alterações no desenvolvimento, na morfologia e na produção de esporos nas linhagens transformantes em relação à linhagem selvagem do fungo.

ABSTRACT

M. anisopliae is an entomopathogenic fungi that infects a variety of arthropods. It is the best characterized entomopathogen having the capacity to penetrate actively through host-cuticle. During the infection, *Metarhizium* produces hidrolases, as proteases, lipases and chitinases that assist the penetration of cuticle of its hosts and also is related to the host-colonization process. Our group has focused the study of genes that act on the penetration stage, in special, characterizing the system of chitin degradation in *M. anisopliae*. Three genes that codify for chitinases have already been characterized in *M. anisopliae*: the gene *chit1*, that codifies an endochitinase of 42 kDa (BOGO, 1998), the gene *chi2* that codifies for a chitinase of 42 kDa and the gene *chi3* that codifies an endo/exo acting chitinase (SILVA et al., 2005). However, only chitinase 30 kDa was demonstrated to be produced during the penetration process. The function of the other two genes is still not determined.

In this work we studied the function of the gene *chit1* in *Metarhizium* by means of overexpression of the chitinase. Here, and in previous work of the group, the gene *chit1* was cloned and characterized and its ORF was cloned in a expression vector based on the homologous promoter of the gene *tef1- α* (*ptef1- α* , NAKAZATO et al., 2006) . In other construction the *chit1* ORF was cloned in the anti-sense orientation in the same vector. The overexpression, as well as the suppression of the expression in the anti-sense, was analyzed in relation to the production of 42 KDa endochitinase and the infectivity of the overexpressing transformants tested in bioassay using tick *B. microplus* to verify its participation in the process of infection. Possible morphologic alterations in the normal cycle of development had been also analyzed. The results shown an increase in the expression of 42 KDa endochitinase in the transformants in relation to the wild-type *M. anisopliae*. In bioassay experiments using ticks differences in the efficiency of infection were not observed neither in the overexpressing transformants nor in the anti-sense construct as compared to the wild-type. Also alterations in development, morphology and production of conidia in the transformants were not detected.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium é um dos gêneros mais conhecidos de fungos entomopatogênicos. A classificação de *Metarhizium* (Sorokin) baseava-se em caracteres morfológicos, revisados por Tulloch (1976), que aceitou apenas duas espécies: *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae*, sendo esta subdividida em duas variedades, var. *minor* e *major*. Recentemente, DRIVER *et al.* (2000) revisaram *clusters* morfológicos de *Metarhizium*, e com base em critérios morfológicos e moleculares, como seqüências de ITS (*internal transcribed spacers*), região D3 do rDNA 28S, rRNA 5,8S e RADP-PCR, sua taxonomia sofreu algumas alterações em relação ao proposto por TULLOCH (1976), sendo reconhecidas três espécies para o gênero *Metarhizium*; estas subdivididas em nove variedades: *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (var. *anisopliae*, var. *majus*, var. *lepidiotum* e var. *acridum*); *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (var. *flavoviride*, var. *minus*, var. *novazealandicum* e var. *pemphigum*) e *Metarhizium album* Petch.

Metarhizium anisopliae foi identificado pela primeira vez por Ilga Metschnikoff, em 1879, isolado de larvas do besouro do grão de trigo *Anisopliae austriaca*, classificando-o de *Entomophthora anisopliae*, que se caracteriza por atacar um grande número de espécies de insetos. Em 1883, Sorokin o classificou como *Metarhizium anisopliae* e desde então a utilização e ação deste patógeno vêm sendo estudada sobre muitas espécies de insetos (ALVES, 1998; ARRUDA, 2005).

O fungo *M. anisopliae* é um fungo filamentosso, deutomiceto, entomopatogênico e acaricida pertencente à classe Hiphomycetes, ordem Moniales, família Moniliaceae. Apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, sobre os quais surgem conídios cilíndricos organizados em colunas (ARRUDA, 2005). Acredita-se que a espécie *M. anisopliae* é capaz de infectar mais de 300 espécies de insetos, incluindo pragas

importantes (ALVES, 1998), como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) (LUNA, 1985) , a cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), vetores de doenças humanas (KANZOK & JACOBS-LORENA, 2006), e é ainda capaz de infectar carrapatos, como *Bophillus microplus* e *Ixodes scapularum* (FRAZZON *et al.*, 2000; CORREIA *et al.*, 1998; ZHIOUA *et al.*, 1997), sendo usado no controle biológico (BITTENCOURT, 1999).

O carrapato *Boophilus microplus* é um ectoparasita bovino que causa perdas econômicas em áreas tropicais e subtropicais, devido à transmissão de doenças e parasitismo causando mortalidade ou desenvolvimento lento desses animais acarretando baixa produtividade (FRAZZON *et al.*, 2000). Entre os microorganismos patogênicos com aplicação em controle biológico destacam-se os fungos filamentosos. Quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela sua penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção (FRANCESCHINI *et al.*, 2001).

Entre os fungos entomopatogênicos, os mais empregados no controle de pragas são o *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*; este fato talvez se deva a ampla distribuição geográfica, à variedade de hospedeiros e às ocorrências em condições naturais (ALVES, 1998).

1.2 O processo de infecção de *Metarhizium anisopliae*

Os fungos entomopatogênicos invadem seus hospedeiros por penetração direta via cutícula (KANG *et al.*, 1999; ST.LEGER *et al.*, 1991a; CLARKSON e CHARNLEY, 1996). O processo de infecção em insetos é bem estudado para *M. anisopliae*, e apresenta as seguintes fases: adesão, germinação, penetração, colonização, reprodução e disseminação do fungo (ALVES, 1998; ST. LEGER *et al.*, 1991b; Figura 1).

O processo é iniciado pela germinação dos esporos quando em contato com a cutícula do hospedeiro, onde, em condições favoráveis de umidade, pH, temperatura, oxigênio e nutrição, o fungo germina sobre o inseto, produzindo o tubo germinativo (ST. LEGER *et al.*, 1991a). Na extremidade desse tubo ocorre a dilatação das hifas, formando uma estrutura denominada apressório, especializada de penetração. Após a formação do apressório ocorre o desenvolvimento da estrutura conhecida como grampo de penetração, que inicia o processo de penetração na cutícula. Essa fase é caracterizada por uma alteração na parede celular da parte do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente. Fase da penetração envolve um processo físico onde há pressão mecânica da hifa terminal através do apressório e grampo de penetração; e um processo químico, referente à produção de enzimas hidrolíticas (proteases, quitinases e lipases) (CLARKSON e CHARNLEY, 1996). A composição complexa da cutícula do hospedeiro sugere que a penetração requer a ação sinérgica de diferentes enzimas. A cutícula do hospedeiro possui duas camadas, a epicutícula e a procutícula, as quais são consideradas as principais barreiras contra o ataque e a penetração de microrganismos. A epicutícula é a camada mais externa de natureza protéica que recobre a procutícula, e é circundada por uma membrana fina composta de ácidos graxos, lipídeos e esteróis. A procutícula compreende a maior parte da cutícula e contém fibrilas de quitina embebidas em uma matriz protéica associada a lipídeos e quitinonas (CLARKSON e CHARLEY, 1996). Assim que o fungo penetra a cutícula do hospedeiro, inicia-se o processo de colonização. As hifas penetrantes sofrem um engrossamento e se ramificam, inicialmente no tegumento do inseto, e posteriormente na cavidade geral do corpo, liberando toxinas e ocasionando sua morte (BIDOCHKA *et al.*, 1997). Após a morte do hospedeiro, as hifas se desenvolvem invadindo os diversos órgãos internos e com o esgotamento de nutrientes as hifas emergem para a superfície, formando um micélio que cobre o tegumento, resultando na mumificação do hospedeiro (MILNER, 2000). Iniciando assim a esporulação do fungo na superfície da cutícula que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos (Figura 1).

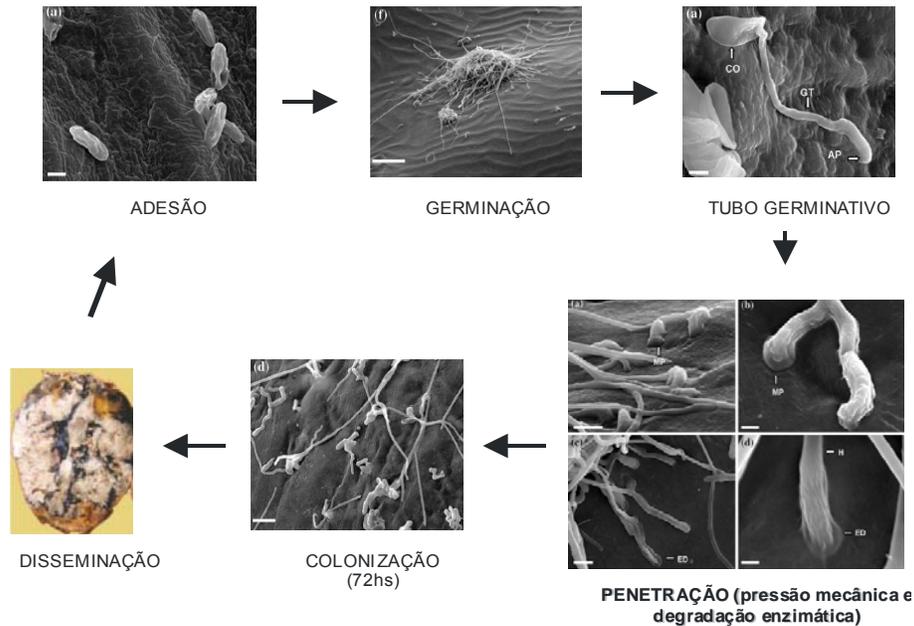


Figura 1- Etapas do processo de infecção de *Metarhizium anisopliae* em *Boophilus microplus* (ARRUDA *et al.*, 2005).

A relação entre a virulência de fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula vem sendo investigada. Muitos genes e enzimas têm sido caracterizados e estudados visando verificar a sua participação no processo de infecção (SMITH *et al.*, 1981; SMITH & GRULA, 1983; CHARNLEY, 1984; ST. LEGER *et al.*, 1986a; BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1988; BOGO *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 2003; SILVA, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2004). Esse processo de infecção do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* em carrapatos e insetos vem sendo alvo de estudos do nosso grupo.

O estudo da secreção dessas enzimas proteolíticas, quitinolíticas e lipolíticas produzidas durante a infecção são importantes para se obter uma correlação com a patogenicidade (MORAES *et al.*, 2003). Entretanto, até o presente, apenas uma protease está comprovadamente envolvida na entomopatogenicidade de *M. anisopliae*, a protease PR1A. Proteases têm um importante papel na degradação da cutícula. Estudos em *M. anisopliae* demonstram que as proteases são as primeiras enzimas produzidas pelo fungo (ST. LEGER *et al.*, 1996a). Essas enzimas degradam proteínas da cutícula, o que

permite uma rápida invasão do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1988). O gene que codifica a protease PR1A foi clonado e caracterizado. Esse gene quando introduzido em *M. anisopliae* em cópias múltiplas e sob o controle do promotor constitutivo heterólogo aumentou a virulência do transformante, diminuindo em 25% o tempo para matar larvas de *Manduca sexta* em relação à linhagem selvagem (ST. LEGER *et al.*, 1996a). Por outro lado, a inativação desse gene apenas reduziu a patogenicidade, sendo capaz de infectar insetos, demonstrando que o processo de penetração do hospedeiro não depende de um único gene ou proteína, ocorrendo um sinergismo entre várias hidrolases (ST. LEGER, & JOSHI, 1997). Lípases estão, supostamente, também envolvidas no processo de infecção, pois lipídios e ácidos graxos são constituintes da cutícula (BEYS SILVA *et al.*, 2005). Quitinases estão envolvidas na morfogênese, e também podem estar envolvidas na patogenicidade.

1.3 Quitina e quitinases

A quitina é um dos mais importantes polímeros naturais, amplamente distribuídas na natureza (DUO-CHUAN, 2006) produzidas por fungos, protozoários, aracnídeos, insetos, crustáceos, nematódeos, e outros invertebrados (TRUDEL & ASSELIN, 1989; MERZENDORFER & ZIMMICH, 2003). É um importante componente estrutural de muitos organismos, como, por exemplo, a parede celular de fungos (HOELL *et al.*, 2005; ADAMS, 2004; SCREEN *et al.*, 2001).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, após a celulose, formado por ligações β -1,4 de 2-acetoamino-2-deoxi-glicopiranosose (N-acetilglicosamina – NacGlc) (BLACKWELL, 1988; Figura 2), e está geralmente ligada a outros polissacarídeos e proteínas (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Estudos de difração de raio-X demonstraram que se refere a uma estrutura cristalina altamente ordenada e insolúvel em água. Encontrada em carapaças de insetos, parede celular de fungos e crustáceos (CABIB, 1987), é a primeira

barreira química contra infecções por fungos (ST. LEGER *et al.*,1986b) e é degradado por quitinases.

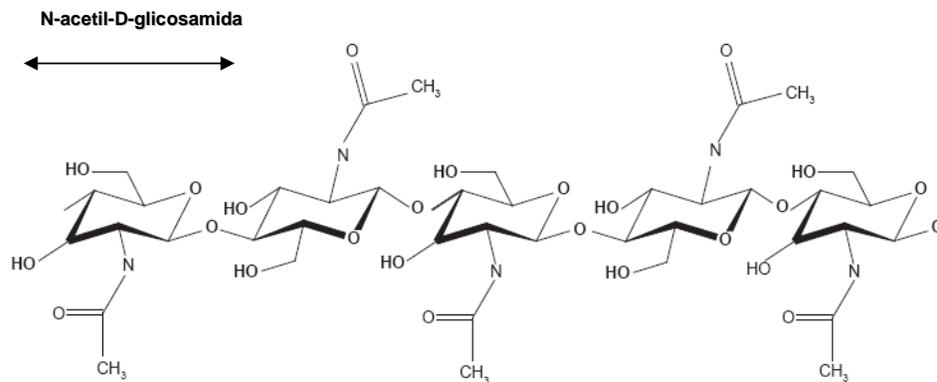


Figura 2 - Estrutura química da quitina. A seta indica uma unidade monomérica de N-acetil-D-Glicosamida (NacGlc)

As quitinases têm sido detectadas em uma grande variedade de organismos, incluindo aqueles que contêm quitina, como insetos, crustáceos, leveduras e fungos (LIMÓN, 2001; THOMPSON *et al.*, 2001; HERRERA-ESTRELLA & CHER,1999). O papel das quitinases nesses organismos são diversos. Em bactérias, as quitinases têm função na nutrição e no parasitismo, enquanto que em fungos, protozoários e invertebrados as quitinases têm funções na morfogênese. Em plantas e vertebrados, as quitinases estão envolvidas em mecanismos de defesa (PATIL *et al.*, 2000; DUO-CHUAN,2006; DAHIYA *et al.*, 2005). Em fungos, além da utilização da quitina como nutriente, as quitinases estão envolvidas na modificação da quitina estrutural constituinte da parede celular. Esses organismos possuem sua parede celular composta de quitina e glicanas, e então produzem enzimas quitinolíticas que estão envolvidas em vários processos fisiológicos (GOODAY *et al.*, 1992) como no crescimento de hifas e morfogênese (SCREEN *et al.*, 1998; ST. LEGER *et al.*,1996b). O papel das quitinases no processo de infecção não é totalmente conhecido. Sabe-se que as

quitinases são detectadas nos estágios finais da penetração, após a secreção das enzimas proteolíticas (ST. LEGER *et al.*, 1991b; PINTO, *et al.*, 1997).

As quitinases hidrolisam a quitina, sendo capazes de promover a clivagem das ligações β -1,4 existentes entre os monômeros de NacGlc produzindo oligômeros, multímeros e monômeros de N-acetilglicosamina (FLACH *et al.*, 1992), que podem ser absorvidos e metabolizados por muitos organismos (ULHOA & PEDEBY, 1991).

Embora não haja um consenso em relação à nomenclatura mais específica destas enzimas, de acordo com os tipos de produtos de hidrólise da quitina, as quitinases podem ser classificadas em duas categorias principais: endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases clivam a quitina aleatoriamente em pontos internos gerando polímeros ou oligômeros de GlcNac, como a quitotetraose, a quitotriose e a diacetilquitobiose. As exoquitinases podem ser divididas em duas categorias; as quitobiosidases, que atuam liberando unidades de diacetilquitobiose a partir da extremidade não-redutora da quitina e em 1,4- β -N-acetilglicosaminidases, que clivam oligômeros produzidos pela atividade de endoquitinases e quitobiosidases, liberando monômeros de GlcNac (SAHAI AND MANOCHA, 1993; Figura 3).

As quitinases são classificadas como glicosil hidrolases. Baseando-se na similaridade da seqüência de aminoácidos das glicosil hidrolases, as enzimas quitinolíticas são agrupadas nas famílias 18, 19 e 20. A família 18 é encontrada em bactérias, fungos, leveduras, vírus, plantas e animais, sendo a família mais diversificada em termos evolutivos. A família 19 compreende, principalmente, quitinases de plantas e algumas quitinases de *Streptomyces*. Estas duas famílias não apresentam nenhuma similaridade em relação às seqüências de aminoácidos e são completamente diferentes nas suas estruturas tridimensionais e mecanismos moleculares. A família 20 das quitinases inclui as β -N-acetilexosaminidases de bactérias, de fungos e de humanos (DUO-CHUAN, 2006; DAHIYA *et al.*, 2005).

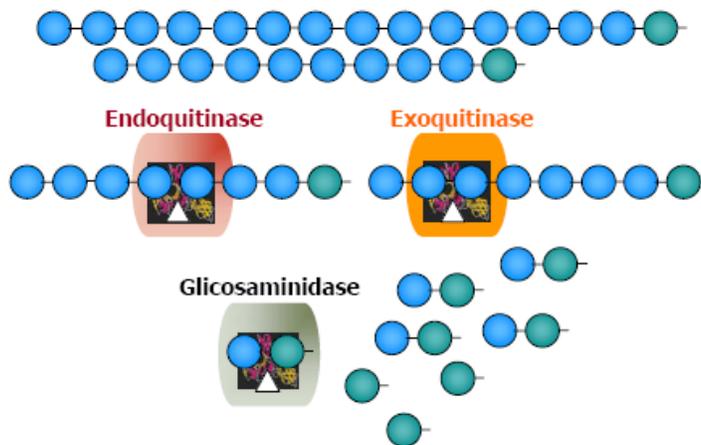


Figura 3 - **Representação esquemática dos mecanismos de ação das quitinases.** Em azul estão representadas as fibras da quitina e em verde os monômeros de NacGlc compreendendo sua fração terminal. Estão representadas as enzimas: endoquitinase em cor de vinho, exoquitinase em laranja e 1,4- β -N-acetilglicosaminidases em cinza. Modificado de SAHAI & MANOCHA, (1993) / (BARATTO, 2005).

A produção de quitinases por fungos na natureza é induzida. A atividade de quitinase é detectada quando fungos são crescidos em meio contendo quitina (HARMAN *et al.*, 1993; LI *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 1998; ST. LEGER *et al.*, 1991b). A expressão de genes de quitina parece ser regulado por um sistema indução-repressão, em que produtos de degradação (como NacGlc e glucosamida) agem como indutores, enquanto glicose ou fontes de carbono metabolizados agem como repressores (MOREIRA, 1998; DUO-CHUAN,2006). Isso foi observado no sistema quitinolítico de *M. anisopliae*, também regulado por um mecanismo de indução-repressão, em que produtos de degradação da quitina, incluindo NacGlc (ST LEGER *et al.*, 1986b) induzem tanto a síntese quanto a secreção de quitinases, enquanto a glicose é um repressor da síntese (BARRETO *et al.*, 2004). A concentração do monômero NacGlc também regula a síntese e a

secreção das quitinases. Baixas concentrações de NacGlc (0,5%) são indutores, enquanto altas concentrações (1%) têm papel repressor (MOREIRA, 1998; MORAES *et al.*, 2003, BARRETO *et al.*, 2004) e glicose age como repressor (CARLSON, 1999).

A repressão por glicose é um fenômeno comum na regulação de genes de quitinases de fungos. Sabe-se que as regiões URS (*upstream regulatory sequence*) presente nos promotores desses genes têm um papel chave na repressão na presença de glicose. A proteína produzida pelo gene regulador *creA/cre1* é um importante fator de transcrição que age negativamente, que se liga a seqüências consenso do DNA SYGGRG na URS (ILMEN *et al.*, 1996). Na presença de glicose, a proteína *creA/cre1* liga-se ao motivo consenso e reprime a transcrição de genes de quitinase (DUO-CHUAN, 2006).

A caracterização de genes de quitinases é um importante passo para o entendimento global do sistema quitinolítico em fungos entomopatogênicos.

1.4 Quitinases em *M. anisopliae*

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* produz diversas quitinases (BOGO *et al.*, 1998; KANG *et al.*, 1998; ST. LEGER *et al.*, 1996a; SCREEN *et al.*, 2001).

As quitinases já descritas incluem duas enzimas de *M. anisopliae* ME1 que foram purificadas a partir de cultivos em quitina bruta (ST. LEGER *et al.*, 1991b). Uma destas enzimas possui 33 KDa, pI 5,4 – 8,6 e possui muitas similaridades com quitinases de outras bactérias. A outra enzima possui 110 KDa, pI 6,4 e é uma quitobiase que hidrolisa principalmente quitobiase.

Outras duas quitinases, de 43,5 e 45 KDa (pI 4,8) foram caracterizados em sobrenadantes de culturas de *M. anisopliae* em presença de cutícula de inseto (barata) como fonte de carbono. Eles mostraram que as quitinases são produzidas em níveis muito baixos pelas estruturas de infecção na superfície da cutícula e durante as fases iniciais da penetração, mas houve altos níveis de quitinase

acumulados nas zonas de degradação proteolítica, que sugere que a liberação da quitinase é dependente da acessibilidade ao substrato (ST. LEGER *et al.*, 1996b).

Na linhagem E6 de *M. anisopliae*, PINTO *et al.* (1997) demonstraram a presença de pelo menos três enzimas com atividade quitinolítica. Uma delas de massa molecular de aproximadamente 30KDa (CHIT30) foi purificada e caracterizada, e através de ensaios enzimáticos, apresentou atividade bifuncional de *exo* e *endo*quitinase.

Outra quitinase de 58KDa que apresentou baixa identidade com seqüências de outras quitinases foi purificada e caracterizada de *M. anisopliae* cultivado em meio contendo quitina coloidal como fonte de carbono, (KANG *et al.*, 1998). O mesmo grupo purificou e caracterizou outra quitinase de *M. anisopliae* linhagem ATCC 20500, possuindo aproximadamente 60KDa (KANG *et al.*, 1999), pH ótimo de 5,0 para atividades de quitinase, similar a outras quitinases já citadas. Através de ensaios enzimáticos, CHIT60 apresentou atividades de *exo* e *endo*quitinase.

1.5 Genes de quitinases isolados de *Metarhizium*

Três genes que codificam quitinases em *M. anisopliae* já foram caracterizados; os genes *chit1*, *chi2* e *chi3* (BOGO *et al.*, 1998; BARATTO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2005). O gene *chit1* (BOGO *et al.*, 1998), apresentado uma ORF de 1.521 pb codifica uma proteína de 423 aminoácidos. Possui três pequenos íntrons típicos de fungos. Os trinta e cinco primeiros aminoácidos apresentam característica de peptídeo sinal. A proteína quando madura possui uma massa de 45 kDa, o que está de acordo com a massa determinada anteriormente por ST. LEGER (1996a). Comparando-se a seqüência de aminoácidos derivada do gene *chit1* encontrou-se alta identidade com duas quitinases (produtos do gene *chiA* da bactéria *Serratia marcescens* e do fungo *Aspergillus nidulans*) que possuem funções biológicas diferentes, agindo no crescimento celular e em processos de nutrição (Appud BARATTO *et al.*, 2003; Appud SILVA *et al.*, 2005).

O gene *chi2* foi descrito por BARATTO *et al.* (2006) e possui uma ORF de 1542 pb que codifica uma proteína de 419 aminoácidos. A proteína madura possui uma massa molecular de 42 KDa (pI 4,8). Essa quitinase possui a massa molecular similar a CHIT42, codificada pelo gene *chit1*, mas há pouca identidade na seqüência de aminoácidos entre essas duas quitinases. Usando a técnica de RT-PCR, BOLDO (comunicação pessoal) encontrou dois transcritos do gene *chi2* (confirmado por seqüenciamento) que apresentam respectivamente 511 e 439 pb. O seqüenciamento mostrou que o amplicon maior representa o transcrito em que o segundo íntron (de 75 pb) não foi excisado.

O gene *chi3*, previamente descrito em *M. anisopliae* var. *acridum* por SCREEN & ST. LEGER (número de acesso AJ293218) e por FREIMOSER *et al.* (2003), foi isolado de *M. anisopliae* (linhagem E6) por SILVA *et al.* (2005). Usando antisoro específico contra a quitinase CHIT30 foi detectada a produção desta proteína durante a penetração de *M. anisopliae* em cutícula de *B. microplus*. Foi realizado *screening* imunológico em biblioteca de cDNA deste fungo, levando ao isolamento de seqüências homólogas ao gene *chi3* previamente descrito em *M. anisopliae* var. *acridum* (SILVA *et al.*, 2005). O gene *chi3* codifica uma quitinase predita de 34 kDa (SILVA *et al.*, 2005), e apresenta um íntron de aproximadamente 60 pb (Charley Staats, comunicação pessoal).

As seqüências dos genes *chi2* e *chi3* têm identidade com as quitinases do segundo grupo da família 18 de quitinases, uma classe de quitinases de plantas, que mostrou ter função morfológica em *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans* (SILVA *et al.*, 2005).

Uma maneira, portanto, de entender a função de quitinase no processo de infecção é o isolamento dos genes de chitinase e avaliação de sua superexpressão em bioensaios utilizando o carrapato *Boophilus microplus*.

1.6 Gene *chit1* e sua superexpressão

O gene *chit1* e o seu cDNA completo foram isolados e caracterizados por BOGO *et al.*, (1998). Esse gene apresenta uma ORF de 1521 pb, possuindo três pequenos íntrons, de 101, 68 e 80pb, típicos de fungos. A ORF codifica uma

proteína de 423 aminoácidos, sendo que os 35 primeiros apresentam características de peptídeo sinal. A seqüência deduzida de aminoácidos prediz uma proteína de 42 KDa e pI de 5,8. Análises por *Southern blot* indicaram que o gene *chit1* está presente em cópia única no genoma de *M. anisopliae*.

BARATTO *et al.*, (2003) expressaram essa quitinase funcional em *E.coli* e mostraram que a enzima recombinante CHIT42 tem atividade de endoquitinase e que apresenta atividade ótima em pH ácido. A quitinase CHIT42 de *M. anisopliae* tem similaridade com a quitinase CHIA de *A. nidulans* (TAKAYA *et al.*, 1998). Contudo, esse fungo não é entomopatogênico e, nesse organismo, a quitinase é parte do sistema enzimático que age no crescimento celular. É possível que a quitinase CHIT42 de *M. anisopliae* esteja envolvida no processo de nutrição e crescimento celular (BARATTO *et al.*, 2003).

Posteriormente, foram construídas linhagens de *M. anisopliae* que superexpressam o gene *chit1* de *M. anisopliae* (BARATTO, 2005). Foi realizada a clonagem da ORF do gene *chit1* nas orientações direta e reversa em um vetor de expressão para *M. anisopliae*. A construção foi realizada a partir do vetor pUC18, onde foram clonados o promotor *tef1- α* de *M. anisopliae* (promotor constitutivo) (NAKAZATO *et al.*, 2006) entre os sítios de restrição EcoRI e KpnI e o terminador do gene *trpC* de *A. nidulans*, entre os sítios BamHI e PstI. Foi clonado gene BAR de *Streptomyces hygroscopicus* (THOMPSON *et al.*, 1987) como marca de seleção a resistência a glifosinato de amônio sob controle do promotor do gene *gpdA* e o terminador *trpC* de *A. nidulans* (PUNT *et al.*, 1990). Sistemas de transformação tem sido uma alternativa para a identificação de genes e a determinação de suas funções (STAATS *et al.*, 2004).

Essas construções serão analisadas quanto à produção de quitinase em sobrenadantes de culturas por ensaios enzimáticos e testados por bioensaios para verificar seus efeitos no processo de infecção de *M. anisopliae*.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Estudar a função do gene *chit1* de *Metarhizium anisopliae*, que codifica uma endoquitinase, e verificar a sua participação no processo de infecção do carrapato *Boophilus microplus*.

2.2 - Objetivos específicos

- Analisar a produção e a secreção de quitinases em transformantes que superexpressa *chit1*;
- Verificar a expressão do gene *chit1* em *M. anisopliae* analisando transformantes que contém o gene *chit1*, sob regulação do promotor *tef1 α* ;
- Verificar o efeito da superexpressão e do anti-senso no processo de infecção no carrapato *Boophilus microplus*;
- Verificar possíveis alterações no desenvolvimento, morfologia e produção de esporos nos dois transformantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

3.1.1- Linhagem de *M. anisopliae*

Foi utilizada a linhagem selvagem de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E6, isolada de *Deios flavopicta* (Homoptera, Cercopidea), gentilmente cedida pelo professor João Lúcio de Azevedo (Coleção da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz - ESALQ - USP). Segundo FRAZZON e colaboradores (2000), esta linhagem é a mais virulenta, sendo a mais eficiente para controlar o carrapato bovino *Boophilus microplus*.

3.1.2 - Transformantes de *M. anisopliae*

Foram construídas, por transformação, duas linhagens de *M. anisopliae* E6 (BARATTO, 2005). A construção pTEFCHIT1, onde o promotor selvagem foi substituído pelo promotor homólogo do gene *tef1-α* (NAKAZATO *et al.*, 2006) e a construção anti-senso pCHIT1ANTI, onde a ORF *chit1* está invertida em relação ao promotor *tef1-α*. Essas linhagens são resistentes ao antifúngico glifosinato de amônio na concentração de 40 mg/mL. A construção desses transformantes foi realizada partindo de um vetor pUC18, onde o promotor *tef1α* de *M. anisopliae* foi clonado entre os sítios de restrição EcoRI e KpnI e o terminador do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* clonado entre os sítios BamHI e PstI. Esses transformantes contêm o cassete com a marca de resistência ao Glifosinato de amônio (gene Bar), sob o controle do promotor do gene *gpdA* e terminador do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*. No sítio de restrição SmaI, foi introduzido o cDNA do gene *chit1*. As construções foram obtidas contendo o gene *chit 1* inserido nas duas orientações, senso e antisenso (pCHIT1 e pCHIT1ANTI; Figura 4).

Esses dois tipos de construções foram utilizados nos experimentos de transformação, e para superexpressão. Esses transformantes foram analisados

quanto à produção de quitinase em sobrenadantes de culturas por ensaios enzimáticos.

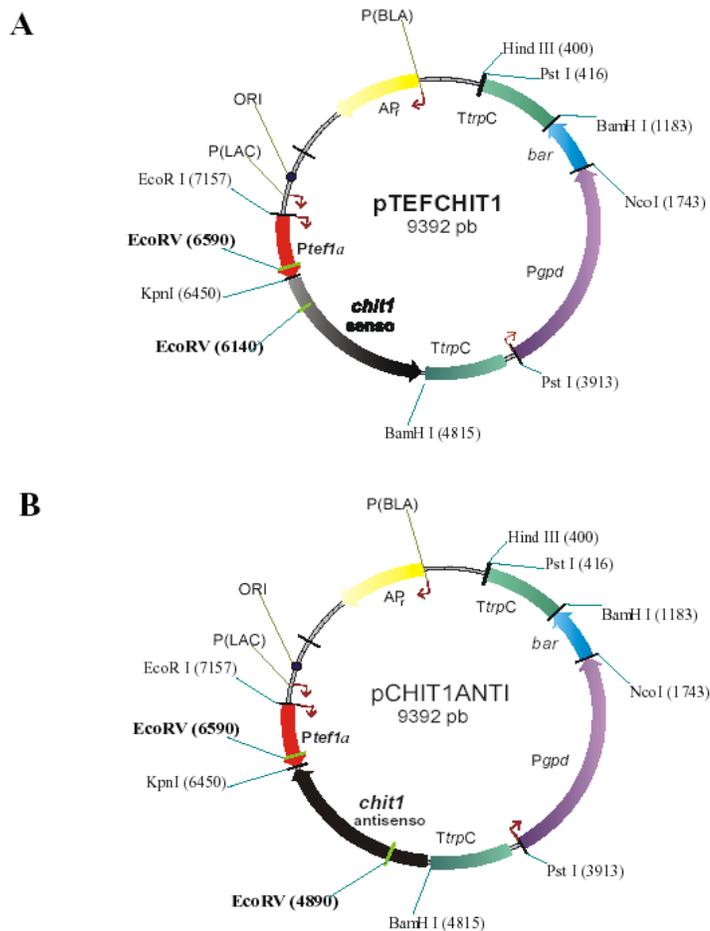


Figura 4 - Mapa físico dos plasmídeos pTEFCHIT1 (A) e pCHIT1ANTI (B) (BARATTO, 2005). Estão representados: o promotor do gene *tef1a* (vermelho), inserido nos sítios de restrição *EcoRI*/*KpnI*, a seqüência do gene *chit1* (em preto), inserido no sítio *SmaI*, na orientação direta (Painel A, construção pTEFCHIT1) e invertida (Painel B, construção pCHIT1ANTI) e a região regulatória terminadora do gene *trpC* de *A. nidulans* (verde escuro) ligados nos sítios de restrição *BamHI*/*PstI*. O cassete contendo promotor do gene *gpdA* (roxo), o cDNA do gene *bar* (azul claro), a região regulatória terminadora do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (verde claro), inseridos nos sítio de *PstI* e a ORF de um gene para resistência à ampicilina (amarelo). Os sítios de *EcoRV*, presentes próximos à extremidade 3' do promotor de *tef1a* e outro, próximo à extremidade 5' do gene *chit1*, estão destacados com negrito.

3.1.3 - Manutenção e cultivo dos microrganismos

Todos os meios de cultivo e soluções utilizados para o crescimento e a manutenção dos microrganismos foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min. Para meios de cultivo sólidos, foi adicionado ágar para uma concentração final de 1,5%. O crescimento e manutenção do fungo selvagem foram feitos em Meio de Cove completo MCc (glicose 1% (m/V); nitrato de Sódio 0,6% (p/V); caseína Hidrolisada 0,15% (p/V); extrato de levedura 0,05% (m/V); peptona 0,2% (p/V)). O pH foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH 10 M. O crescimento e manutenção dos transformantes foram feitos em Meio de Cove MC (glicose 1% (p/V); nitrato de sódio 0,6% (p/V)). Após a esterilização em autoclave, foram adicionados assepticamente Solução de Sais 2% (KCl 2,6% (p/V); MgSO₄.7H₂O 2,6% (p/V); KH₂PO₄ 7,6% (p/V) e Solução de Elementos Traços 0,04% (Na₂B₄O₇.7H₂O 0,004% (m/V); CuSO₄.5H₂O 0,04% (m/V); FeSO₄ 0,001% (m/V); Na₂MnO₄.2H₂O 0,08% (m/V); MnSO₄.2H₂O 0,08% (m/V); ZnSO₄.7H₂O 0,08% (m/V)). Para a seleção dos transformantes foi adicionado ao meio de cultura 40 mg/mL de glifosinato de amônio. As culturas foram incubadas em estufa a temperatura de 28°C por até sete dias.

3.1.4 - Suspensão de esporos de *M. anisopliae*

Esporos de *M. anisopliae* foram coletados a partir de culturas em placas de Petry em meio MCc sólido incubadas a 28°C por sete dias, até a esporulação. Com o auxílio de alça de Drigalski e de 10 mL de solução de Tween 80 0,01%, os esporos foram coletados. A suspensão obtida foi lavada com água destilada estéril e centrifugada (5.000 g durante 7 min). Os esporos foram ressuspensos em água destilada estéril e contados em Câmara de Neubauer. Foi testada a presença de contaminantes nas suspensões, retirando-se 10 uL das mesmas e colocando-as em um tubo de ensaio contendo 3mL de meio LB líquido. Estes foram incubados em um agitador a 37°C durante 24 hs. Suspensões contendo cerca de 10⁸ esporos· mL⁻¹ foram estocadas a 4°C até o uso por, no máximo, duas semanas.

3.1.5 - Cultivo de *M. anisopliae* e das linhagens transformantes em diferentes fontes de carbono

M. anisopliae foi cultivado conforme condições definidas para cada experimento. Para verificar a atividade da quitinase, foram cultivados em MC líquido acrescidos das seguintes fontes de carbono: glicose 1%; quitina cristalina (SIGMA) 1 % e cutícula de carrapato *Boophilus microplus* 1%, durante os seguintes tempos: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120h e 144h. As culturas com glicose 1%, como fonte de carbono, foram suplementadas a cada 24 h, com uma solução de glicose 50%. Após a incubação, o meio foi filtrado em papel filtro (WHATMAN N°1) e os sobrenadantes foram utilizados para a realização dos ensaios enzimáticos e análise em SDS-PAGE. Cada cultivo foi realizado em triplicata.

Os sobrenadantes das culturas foram estocados a -20°C para posterior realização de ensaios enzimáticos de quitinase e de açúcar redutor. Também foram retiradas e estocadas alíquotas de 1 mL de cada cultivo a cada 24 horas, quando realizada a reposição do açúcar específico (glicose) para posterior realização da determinação de açúcares redutores.

Os frascos utilizados, assim como a temperatura e a velocidade de agitação foram padronizados para que as condições oferecidas fossem mantidas durante todo o experimento.

3.1.5.1 - Preparação de cutículas

Cutículas do carrapato *B. microplus* foram obtidas a partir de teleóginas ingurgitadas, gentilmente cedidas pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Após cortar as extremidades dos carrapatos, o sangue contido no seu interior foi retirado por esmagamento. As cutículas foram exaustivamente lavadas com água corrente e, depois de limpas, foram esterilizadas em autoclave (120°C durante 20 min) e armazenadas em água destilada a 4°C.

3.2 - Ensaio enzimáticos

3.2.1 - Quantificação de proteínas

O método de BRADFORD (1976) foi usado para quantificar as proteínas secretadas no meio de cultura. Foram adicionados a 800 μL de amostra, 200 μL do reagente de BRADFORD ("Protein Assay, Bio Rad"). A mistura foi agitada vigorosamente e a leitura foi realizada em uma absorbância a 595 nm. A curva padrão foi feita em albumina sérica bovina (BSA) dissolvida em água destilada nas concentrações de 0 a 50 $\mu\text{g/mL}$ (p/v).

3.2.2 - Ensaio enzimático para a detecção de quitinase

Para determinar a atividade enzimática de quitinase de sobrenadantes de cultivos em diferentes fontes de carbono de *M. anisopliae*, foi utilizada quitina coloidal como substrato, com modificações da metodologia de ULHOA & PEBERDY (1991). A quantidade do produto formado, N-acetil-D-glicosasamida (GlcNac), foi medida colorimetricamente conforme modificação do método de REISSIG *et al.* (1955). As reações continham 500 μL da amostra dialisada, 500 μL do substrato e 500 μL de tampão de acetato (50 mM). As reações foram incubadas a 37°C overnight, sob agitação branda. A reação foi centrifugada por 5 min a 2000 g. Do volume final de 1,5 mL de reação, foram transferidos 250 μL para tubo de ensaio contendo 50 μL de ácido bórico 0,8 M pH 9,1. A mistura foi fervida por 3 min e resfriada rapidamente em gelo. Após, foram adicionados 1,5 mL de solução DMAB 1x (p-dimetilaminobenzaldeído 1,0% (m/v)/HCl 1,25% (v/v) em ácido acético glacial). A mistura foi incubada a 37°C por 10 min, para desenvolvimento e estabilização da coloração. As reações foram quantificadas por medida em espectrofotômetro a 585 nm. Uma unidade (U) de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de GlcNac por min por mL conforme as condições descritas acima. A atividade específica foi calculada pela relação entre atividade de quitinase (U) e proteína total (μg).

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Como controle foi utilizado branco da reação (excluindo apenas a amostra - contendo tampão acetato, substrato e água) e branco total (contendo tampão acetato e água).

3.2.3 - Quantificação de açúcar redutor

As concentrações de açúcares residuais presentes nas amostras de diferentes tempos de cultivo de *M. anisopliae* em meios contendo glicose foi determinada conforme modificações do método descrito por MILLER (1959). As reações continham 100 µL de cada amostra e 1 mL de DNS (ácido 2,5-dinitrossalicílico - DNS 1,0%; NaOH 0,4M; KNaC₄H₄O₆ x 4H₂O 30%), fervendo-se por 3 min cada uma. A quantificação foi feita por medida em espectrofotômetro a 550 nm. A curva padrão foi feita utilizando glicose na concentração de 0 a 1 mg/mL (m/v).

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Os controles foram feitos utilizando-se água ao invés da amostra.

3.3 - Eletroforese

3.3.1 - SDS-PAGE

As proteínas foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida segundo LAEMMLI (1970). A solução do gel separador a 12% continha: Tris-HCl 375 mM pH 8,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 12% (29:1, m/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (m/v) e a solução do gel concentrador a 4% continha: Tris-HCl 125 mM; pH 6,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 4% (29:1, m/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (m/v) . Após a polimerização o sistema foi montado em uma cuba apropriada e preenchida com tampão de corrida 1X (Tris base 0,3% (p/v); glicina 1,44% (m/v); SDS 0,1% (m/v)). As amostras foram preparadas e aplicadas no gel.

Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com azul de Coomassie coloidal por 16h ("Coomassie Brilliant Blue" – G250 0,05% (p/v); sulfato de amônio

10% (m/v); metanol 20% (v/v); ácido fosfórico 2%) e foram descorados em água destilada.

Os padrões de massa molecular utilizado foram da *BenchMark™ protein ladder* que possui 15 proteínas recombinantes de peso molecular de 10 a 220 KDa.

3.3.2 - Gel para detecção de atividade quitinolítica em SDS-PAGE

O gel para detecção de atividade de quitinases foi preparado de acordo com o protocolo descrito por ST. LEGER et al. (1993), com glicol quitina como substrato.

A solução do gel separador 12% tinha (SDS-PAGE): Tris-HCL 375mM/ pH 8,8/ SDS 0,1%/ acrilamida-bisacrilamida 12%(29:1, m/v)/ Glicol quitina 0,01% (v/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05 (m/v). A solução do gel concentrador 4% terá: tris-HCL 125mM; pH 6,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 4% (29:1, m/v); TEMED 0,05% (v/v), persulfato de amônio 0,05% (m/v). Após a polimerização o sistema foi montado em uma cuba apropriada e preenchido com o tampão de corrida 1X (Tris base 0,3% (m/v); glicina 1,44% m/v); SDS 0,1% (m/v)).

Após a eletroforese, o gel foi agitado gentilmente por 20 horas a 30 °C em tampão acetato de sódio 100mM; pH 5,4; Triton X-100 1% (v/v). O gel foi corado com uma solução recém preparada de “Calcofluor White M2R” 0,01% (m/v) em Tris-HCL 500 mM; pH 8,9 por 10 minutos e descorado diversas vezes em água destilada. As regiões com hidrólise de glicolquitina foram visualizadas sob luz U.V. e fotografadas.

3.4 - Bioensaios – infecção de carrapatos

Para o bioensaio, foram utilizadas teleóginas para cada isolado de *Metarhizium* a ser analisado. As fêmeas de *Boophilus microplus* foram mergulhadas subsequente em solução de hipoclorito de sódio 2,5%, solução

salina 0,87% e água destilada estéril. Em seguida, cada grupo de teleóginas foi mergulhados por cerca de 30 seg nas suspensões de conídios (1×10^8 conídios. mL^{-1}) dos isolados E6 (controle positivo), e os transformantes pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI. Posteriormente os carrapatos foram acondicionados em câmaras úmidas (>90% de umidade), sendo colocadas em média 15 teleóginas em cada placa de Petri. As placas foram incubadas em câmara de germinação mantidas em estufa tipo B.O.D à 28°C e diariamente foi realizada a observação dos carrapatos e contagem dos mortos. O controle negativo foi realizado imergindo os carrapatos em água destilada estéril e mantendo-os nas mesmas condições dos grupos tratados.

3.5 - Manipulação de ácidos nucleicos

3.5.1 - Extração de DNA genômico de *M. anisopliae*

Para a extração de DNA genômico de *M. anisopliae*, aproximadamente 10^6 esporos- mL^{-1} do fungo foram inoculados em 100 mL de meio de cultivo líquido MC. O micélio foi coletado por filtração a vácuo e depois de filtrado e lavado com água, 1g de micélio foi pulverizado em gral com nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino seco em papel Whatman nº1 e macerado em nitrogênio líquido até a condição de pó. O pó foi transferido para um tubo e foi acrescentado 10 mL de TEX (Tris-HCl 200mM pH 8,0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 1% (v/v)) por g de micélio e misturado até a completa homogeneização, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. Após 15 min de incubação a 65°C, foi procedidos a extração com 0,5 volume de fenol hidratado e centrifugado a 5.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e procedido a extração com 0,5 volume de fenol-clorofórmio e foi centrifugada novamente a 5.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi coletado e procedida a extração com 0,5 volume de clorofórmio. Após, uma nova centrifugação (5.000 x g, 20 min) foi realizada. A fase aquosa foi coletada e o DNA precipitado com adição de NaCl 0,2 M e 2 volumes de etanol absoluto a -20°C, mantido overnight -20°C. O DNA coletado por centrifugação (5.000 x g, 20 minutos) foi seco e ressuspenso em 200 μL de água destilada estéril. Sua

concentração foi estimada com o auxílio de um marcador de tamanho de fragmentos de DNA, λ /HindIII, após eletroforese em gel de agarose.

3.5.2 - Extração de RNA de *M. anisopliae*

Todos os tampões e soluções utilizados para preparação e manipulação de RNA foram preparados com água DEPC (0,001% de dietilpirocarbonato). As vidrarias e espátulas foram tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 3% e lavadas com água DEPC para evitar contaminação com RNases.

Esporos do fungo foram inoculados e incubados como descrito. O micélio foi pulverizado em nitrogênio líquido e transferido rapidamente para falcon previamente preenchido com 0,75 mL de tampão de lise (NaCl 600mM; EDTA 10mM; Tris-HCl pH 8,0 100mM; SDS 4% (v/v)) e 0,3 mL de fenol pH 8,0. A mistura foi agitada por 20 s min e centrifugada por 10 min a 14.000 g. A fase aquosa foi extraída com 0,5 V de fenol tamponado e 0,5 V de clorofórmio, sendo as fases separadas por centrifugação por 10 min a 10.000 g. O conteúdo foi misturado com acetato de sódio 300 mM pH 5,2 e 2 V de etanol absoluto e precipitado por 18 hs a -70°C . Após as 18 hs o material foi coletado por centrifugação por 10 min a 10.000 g e em seguida lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 30 μL de água DEPC. A concentração e a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

3.5.3 - Eletroforese de DNA em gel de agarose

Foi utilizado o sistema de eletroforese horizontal com gel submerso, sendo o preparo dos géis realizado como descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001). A agarose, na concentração de 0,8%, foi fundida em TAE 1x (pH 8,2; Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM), adicionando brometo de etídio (1mg/mL (m/v)) para a concentração final de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. A eletroforese foi realizada em cubas contendo tampão TAE 1x, utilizando fontes Power PAC (Bio Rad), 2-5 V/cm.

Foi adicionado ao DNA a ser analisado, tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%; Xilene cyanol FF 0,25%; Ficoll 15%) em uma concentração

final de 1/10 do volume de 12 μL . Após a eletroforese, o DNA foi visualizado em transluminador de UV com comprimento de onda curto (Fotodyne). O tamanho dos fragmentos de DNA foi estimado com base nos padrões dos fragmentos gerados pela clivagem do DNA de fago λ com *HindIII* (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.5.4 - Tratamento de RNA com enzima Dnase I

Todas as amostras de RNA foram tratadas com a enzima Dnase I (Invitrogen - Live Technologies) para remoção de DNA genômico contaminante. Foram tratados, para cada reação, aproximadamente 1 μg de cada amostra com 1 μL de tampão de reação para a enzima Dnase I, 1 μL de enzima Dnase I (1 U/ μL) e água DEPC suficiente para 10 μL . As amostras foram incubadas por 30 min a 37°C. A enzima foi inativada adicionando-se 1 μL de EDTA 25 mM e incubando por 15 min a 65°C.

Após o tratamento com a enzima, foi realizada uma reação de PCR em um total de 25 μL , com 1 μL de cada amostra de RNA, para a verificação da presença ou não de DNA genômico contaminante na amostra.

3.5.5 - Amplificação por RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Os RNAs extraídos de *M. anisopliae* (item 3.5.2) cultivados em glicose 1%, quantificados e tratados com enzima Dnase I (item 3.5.4), foram utilizados para síntese da primeira fita do cDNA. Foi utilizada a enzima Transcriptase Reversa M-MLV com seu respectivo tampão e soluções e oligonucleotídeo poli-T, sendo seguidas as especificações do fabricante (Invitrogen - Live Technologies) Para uma reação inicial de 12 μL , foi adicionado 1 μL de oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ (CDS, 10 pmol/V), 1 μg de RNA total, 1 μL de mix de dNTP. A reação foi aquecida a 65°C por 5 min. Após, acrescentou-se 4 μL de tampão 5x, 2 μL de DTT 0,1 M e 1 μL da enzima Rnase OUT (20 U/ μL). Incubou-se a 37°C por 2 min, acrescentou-se 1 μL

de M-MLV 200 U e incubou-se a 37°C por 50 min, com inativação da reação a 70°C por 15 min.

Após a síntese da primeira fita, 1 a 5 µL foram adicionados para a reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene *chit1* (Tabela 2).

O controle interno foi o gene de *tef-1α* (NAKAZATO *et al.*, 2006), e *tub* com os oligonucleotídeos #*tef1F* e #*tef1R*, #*tubF* e #*tubR* (Tabela 2).

3.5.6 - Amplificação de DNA pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As amplificações foram realizadas conforme as condições para as reações especificadas na Tabela 1. As reações foram efetuadas em termociclador PTC 200 (MJResearch). Para a otimização e ajuste de cada reação, foram alteradas as temperaturas e os tempos para cada par de *primers* utilizados, como indicado nos itens 3.5.6.1., 3.5.6.2., 3.5.6.3., 3.5.3.4., 3.5.6.5.

Tabela 1 - Componentes das reações de amplificação de DNA por PCR

Componentes	Volume (µL)	Concentração
Tampão de reação	2,5	10x
MgCl ₂	2	50 mM
DNTPs	2,5	1 mM
Primer F	1,0	20 pmol/µL
Primer R	1,0	20 pmol/µL
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,5	5U
DNA molde	1,0	100-200 ng
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 25	

3.5.6.1 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #PANDOWN e #PANUP (Tabela 2)

Condições: 94°C por 5 min, repetindo 30 vezes 94°C por 45s, 55°C por 45s, 72°C por 45 s, e por fim, 72°C por 5 min.

3.5.6.2 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tef1F e #Chit1R; #tef1F e #Chit1F (Tabela 2)

Condições: 94°C por 5 min, repetindo 30 vezes 94°C por 30 s, 55°C por 30s, 72°C por 1min30 s, e por fim, 72°C por 5 min.

3.5.6.3 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #chit1R e #chit1F (Tabela 2)

Condições: 94°C por 5 min, repetindo 30 vezes 94°C por 45 s, 60°C por 45s, 72°C por 50 s, 72°C por 5 min e por fim, 4°C por 1 min.

3.5.6.4 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tef1F e #tef1R (Tabela 2)

Condições: 94°C por 5 min, repetindo 23 vezes 94°C por 45 s, 60°C por 45s, 72°C por 30 s, e por fim, 4°C por 1 min.

3.5.6.5 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tubF e #tubR (Tabela 2)

Condições: 94°C por 5 min, repetindo 23 vezes 94°C por 45 s, 60°C por 45s, 72°C por 30 s, e por fim, 4°C por 1 min.

3.5.6.6 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos (Tabela 2) foram sintetizados pela empresa Invitrogen Brasil Custom Primers – Life Technologies.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeo	Seqüência
PANUP	5' - TCCCACTTCATGGCAGCTTGA - 3'
PANDOWN	5' - TCCAGATTCGTCAAGGTGTTTGA - 3'
chit1F	5' - GCTGTCTACTTCACCAATTG - 3'
chit1R	5' - CCACGTCCACCCTCCAAT - 3'
BARF	5' - GAATTCCCATGGCCATGAGCCCAGAACGAC - 3'
BARR	5' - GGATCCTCAGATCTCGGTGACGGG - 3'
tef1F	5' - CTTCAAGTACGCATGGGTTC - 3'
tef1R	5' - CACATAGGCTTGGAGGGAAC - 3'
Tub F	5' - TAACCAAATTGGTGCTGCT - 3'
Tub R	5' - TGATGGCCACATTCTCCGTCG - 3'

4. RESULTADOS

4.1 - Análise das construções com o gene *chit1* de *M. anisopliae*.

Essas construções fizeram parte da Tese de Doutorado de César Baratto (BARATTO, 2005). Visando verificar as construções para a superexpressão do gene *chit1* foram realizadas PCRs para amplificação de genes presentes nos plasmídeos pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI (Figura 4).

Foi realizada a primeira reação de PCR com a amplificação do gene BAR (resistência ao glifosinato) dos transformantes TCHIT1.1, TCHIT1.2, TCHIT1.3, TCHIT1.4, TCHIT1.5, TCHIT1.6 e TCHIT1ANTI, com os oligonucleotídeos #PANUP e #PANDOWN (Figura 5, Painel B) gerando um amplicon de 560pb. A presença do amplicon foi confirmada para todos os transformantes como mostrado na Figura 5, Painel C.

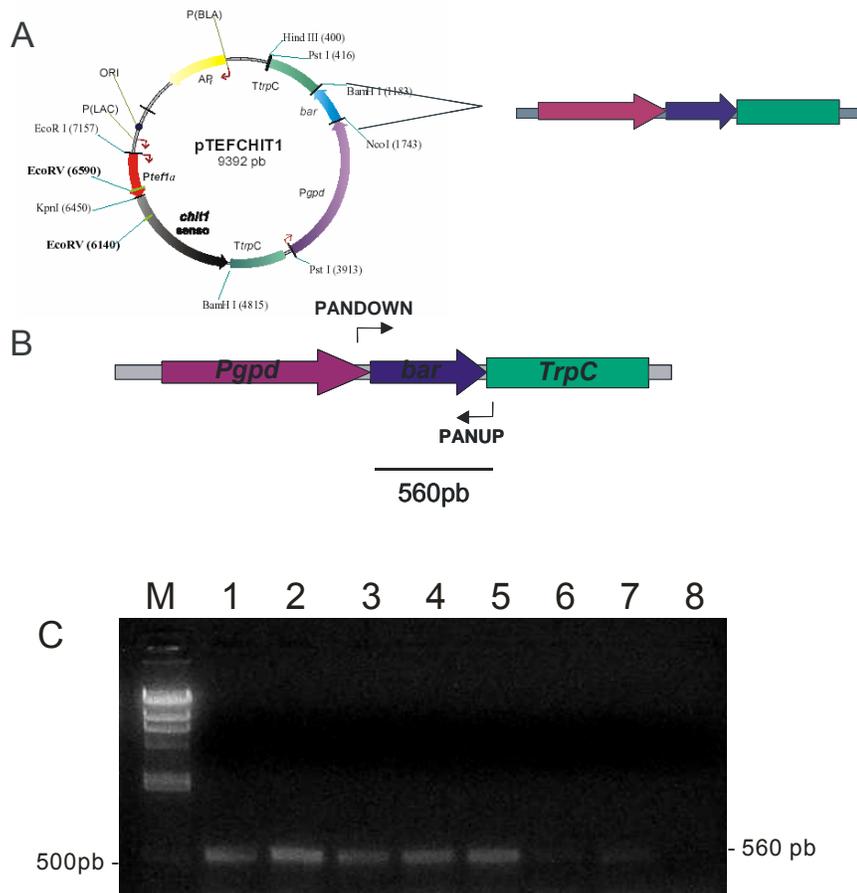
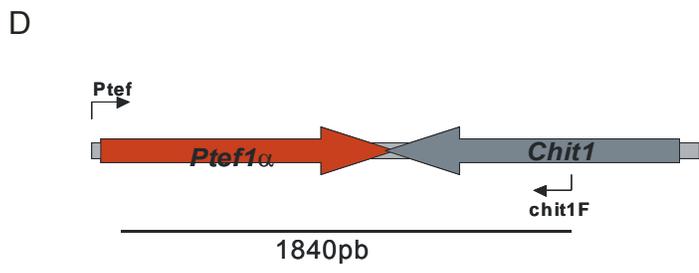
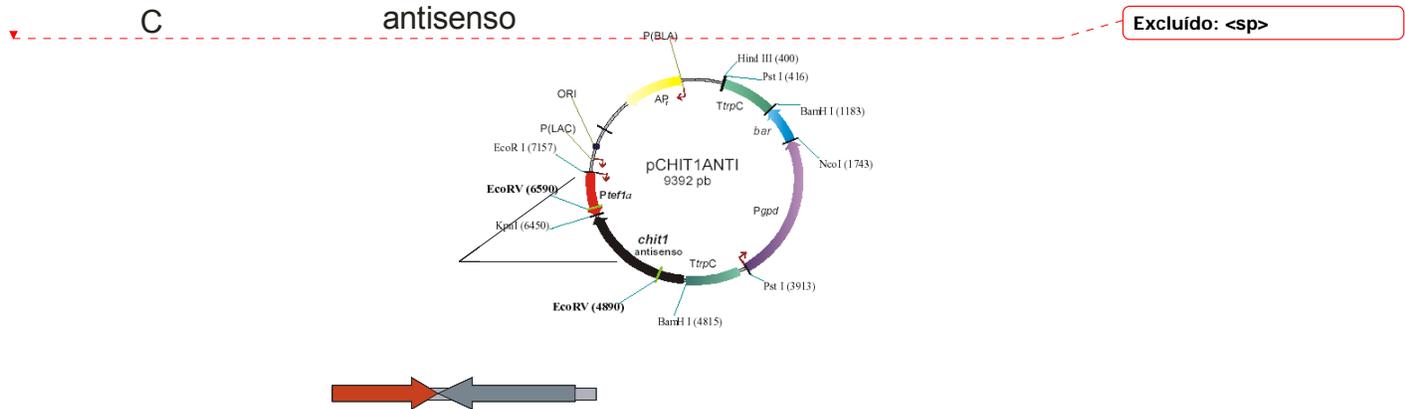
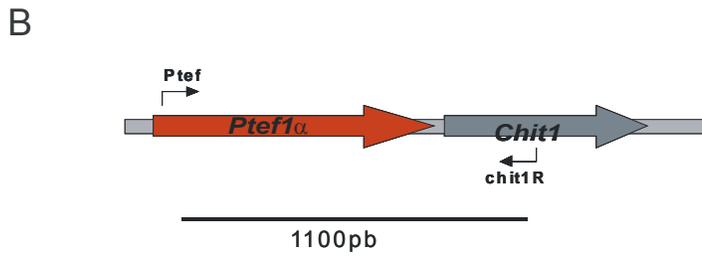
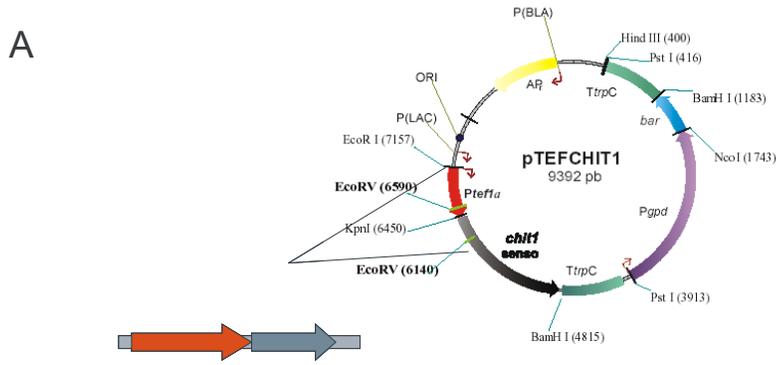


Figura 5 - **Confirmação da presença do gene *bar* nas construções.** (A) mapa físico da região codificante do gene *BAR*. (B) amplicon gerado utilizando os oligonucleotídeos PANUP e PANDOWN, as flechas indicam a posição relativa dos *primers* utilizados no PCR. (C) Gel de agarose 0,8 %. O amplicon gerado a partir do gene *BAR* apresenta 560 pb (traço). Canaletas: (M) marcador λ /HindIII; (1) PCR utilizando cDNA do transformante TCHITANTI (2) TCHIT 1.1; (3) TCHIT 1.2; (4) TCHIT 1.3; (5) TCHIT 1.4; (6) TCHIT 1.5; (7) TCHIT 1.6 e (8) controle negativo da reação sem DNA molde.

Para verificar a presença do promotor do gene *tef1 α* de *M. anisopliae*, foi realizada a reação de PCR com a amplificação de parte do promotor e do gene *chit1*, com os oligonucleotídeos #pTef e os primers internos #chit1R para a construção senso (Figura 6, Painel A e B) e #chit1F para a construção antisenso (Figura 6, Painel C e D), gerando um amplicon de 1100pb para a construção senso e de 1840pb para a construção antisenso, confirmando a presença do promotor (Figura 6, Painel E).



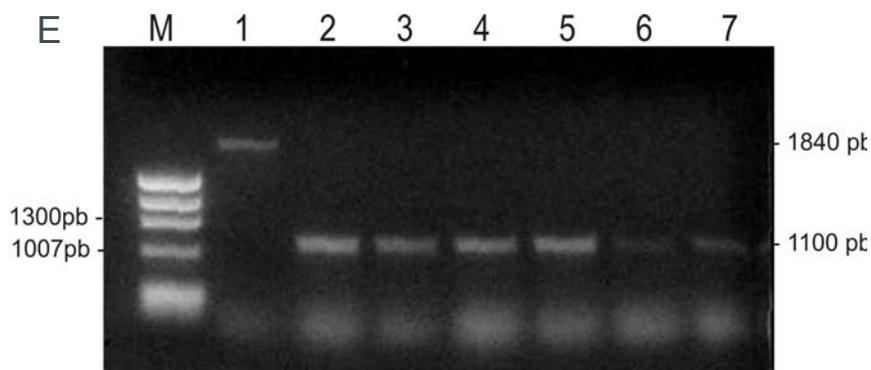


Figura 6 - **Análise de transformantes resistentes ao glifosinato quanto à presença do promotor *Ptefa*.** (A) mapa físico da região codificante do promotor do gene *tef1 α* de *M. anisopliae*, na direção senso. (B) amplicons gerados utilizando os oligonucleotídeos pTef e chit1R, as flechas indicam a posição relativa dos *primers* utilizados no PCR. (C) mapa físico da região codificante do promotor do gene *tef1 α* de *M. anisopliae*, na direção antisenso. (D) amplicons gerados utilizando os oligonucleotídeos pTef e chit1F, as flechas indicam a posição relativa dos *primers* utilizados no PCR. (E) Gel de agarose 0,8 %. O amplicon gerado a partir do gene *chit1* da construção antisenso apresenta 1840 pb e o amplicon gerado a partir do gene *chit1* da construção senso apresenta 1100 pb. Canaletas: (M) marcador Hae III; (1) transformante TCHITANTI (2) TCHIT 1.1; (3) TCHIT 1.2; (4) TCHIT 1.3; (5) TCHIT 1.4; (6) TCHIT 1.5; (7) TCHIT 1.6.

Para a confirmação da construção dos transformantes que superexpressam o gene *chit1*, foram utilizados os oligonucleotídeos #chit1R e #chit1F, derivados da seqüência do gene *chit1* de *M.anisopliae* (BOGO *et al.*,1998) que flanqueiam os três íntrons, permitindo assim a distinção entre a cópia genômica, que gera um amplicon de 472pb e a cópia de cDNA, que gera um amplicon de 230pb presente nas construções pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI (Figura 7, Painel A). Foi confirmado a presença da cópia do cDNA para os transformantes (TCHIT1.2, TCHIT1.3, TCHIT1.4, TCHIT1.5, TCHIT1.6 e TCHIT1ANTI), exceto para o transformante TCHIT1.1, que pode ter perdido o cassette contendo o cDNA do gene *chit1* (Figura 7, Painel B). Foi detectado um amplicon de 230 pb nos transformantes TCHIT1.3, TCHIT1.4 mais intenso comparado com os outros transformantes, sugerindo mais de uma cópia do cDNA (230pb) inserido no DNA genômico de *M. anisopliae* (Figura 7, Painel B, canaletas 5 e 6).

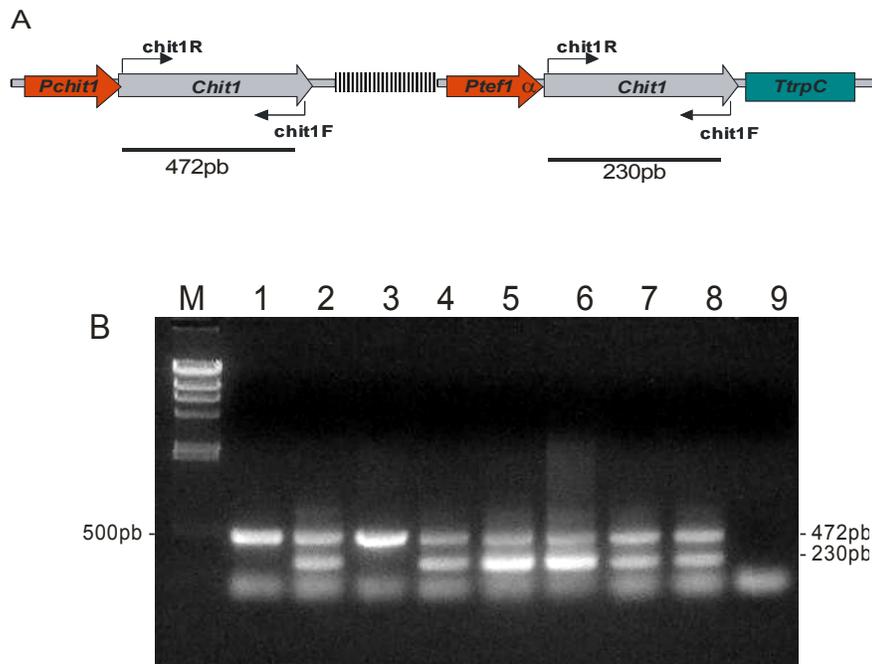


Figura 7 - **Análise de transformantes resistentes ao glifosinato quanto à presença do cDNA do gene *chit1*.** (A) - mapa físico da região codificante do gene *chit1*. As flechas indicam a posição relativa dos *primers* utilizados no PCR. (B) - Reação de amplificação utilizando os oligonucleotídeos *chit1F* e *chit1R*. O amplicon gerado a partir do gene *chit1* selvagem apresenta 472 pb e o amplicon gerado a partir do cDNA do gene *chit1* (construções pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI) apresenta 230 pb. Gel de agarose 0,8%. Canaletas: (M) marcador λ /HindIII; (1) DNA genômico de *M. anisopliae* selvagem (2) TCHIT ANTI; (3) TCHIT 1.1; (4) TCHIT 1.2; (5) TCHIT 1.3; (6) TCHIT 1.4; (7) TCHIT 1.5; (8) TCHIT 1.6 e (9) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.2 - Produção de proteínas durante o cultivo de *M. anisopliae* transformantes em meio adicionado em diferentes fontes de carbono

A secreção de proteínas totais foi analisada durante o cultivo de *M. anisopliae* e os transformantes (TCHIT1.2, TCHIT1.3 e TCHIT1ANTI) em Meio de Cove adicionado de diferentes fontes de carbono/nitrogênio (cutícula de *Boophilus microplus* 1%, quitina cristalina 1% e glicose 1%). Os transformantes analisados

foram escolhidos de acordo com os dados mostrados na Figura 7 para verificar se há diferença na secreção de proteínas e de quitinases entre a linhagem selvagem, o transformante com a construção antisense (TCHITANTI), o transformante com a construção senso com uma única cópia do cDNA (TCHIT1.2) e o transformante com construção senso com mais de uma cópia do cDNA (TCHIT1.3).

Os resultados da secreção de proteínas totais de *M. anisopliae* selvagem e transformantes nos sobrenadantes das culturas estão representados graficamente na Figura 8.

Durante os seis dias de cultivo, as proteínas secretadas da linhagem selvagem e dos transformantes apresentou um crescimento exponencial, não havendo diferenças significativas entre as linhagens, demonstrando o desenvolvimento do fungo em todos os cultivos (Figura 8 A, B e C). Ocorreu menor quantidade de proteína secretada em meio adicionado de quitina cristalina 1%, sendo aproximadamente 5,7 vezes menor em relação ao meio com glicose 1% e aproximadamente 4,4 vezes menor em relação ao meio com cutícula em 144 horas de cultivo.

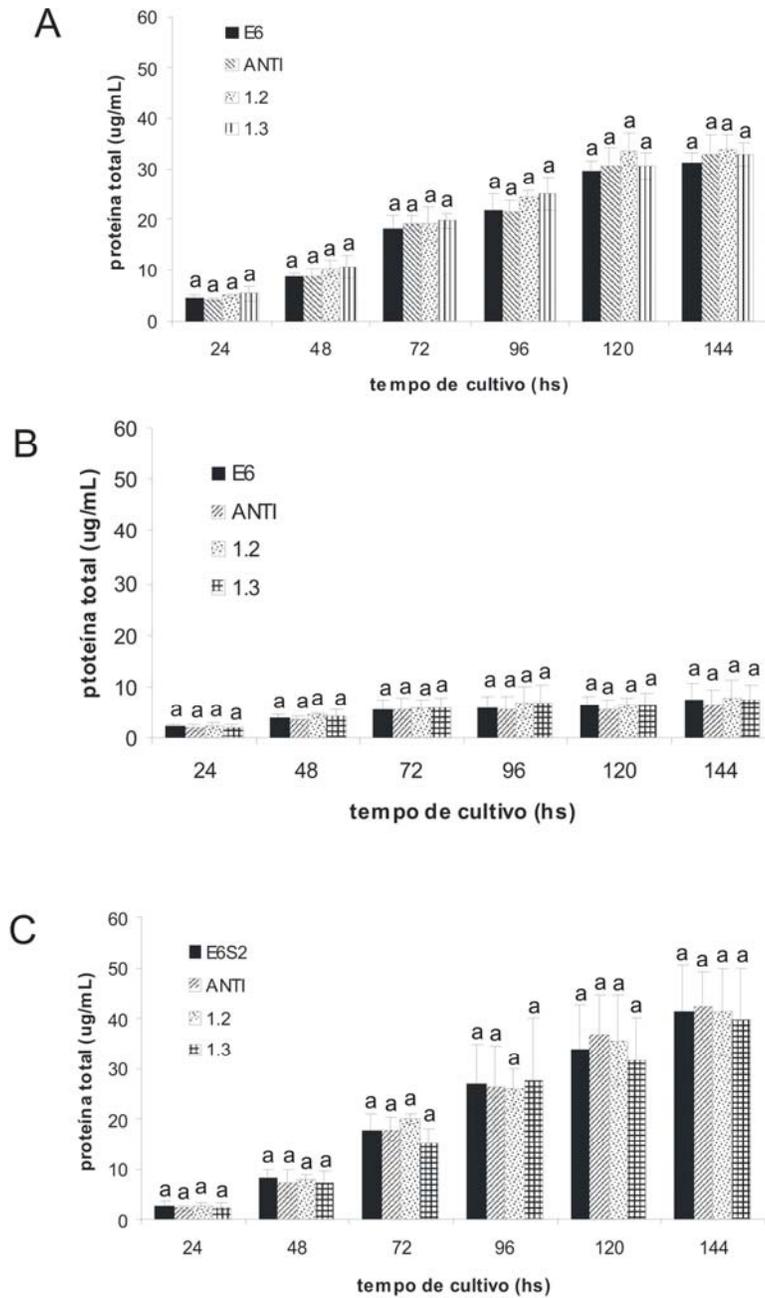


Figura 8 - **Secreção de proteínas totais de cultivos de *M. anisopliae* e transformantes em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos.** (A) cultivo em cutícula de *B. microplus* 1%; (B) cultivo em quitina cristalina 1%; (C) cultivo em glicose 1%. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética. As médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre as linhagens para cada tempo a partir dos dados analisados pelo teste ANOVA – Tukey HSD ($\alpha \leq 0,05$).

Verificamos o perfil das proteínas dos sobrenadantes de culturas analisados por SDS-PAGE. Utilizamos uma condição com um substrato que induz a produção de quitinases (cutícula 1%) e em uma condição com um substrato que reprime a produção de quitinases (glicose 1%). Os cultivos foram incubados nos tempos de 72, 96, 120 e 144 horas, como mostrado na Figura 9. Foram aplicadas 75 µg de proteína de cada amostra, precipitadas a partir de volumes diferentes de cada cultivo. A análise das amostras em SDS-PAGE mostrou uma diferença na expressão das proteínas nos dois cultivos (cutícula 1% e glicose 1%) e nos quatro tempos de cultivo (72, 96, 120 e 144 horas) (Figura 9), mas com a presença de uma proteína de aproximadamente 30 KDa no meio contendo cutícula 1% nos quatro tempos de cultivo (72, 96, 120 e 144 horas) (setas vermelhas). Nos tempos de 96 horas (Figura 9 B), 120 horas (Figura 9 C) e de 144 horas (Figura 9 D) detectamos a presença de uma proteína de aproximadamente 40-45 KDa (setas pretas), supostamente representando a quitinase CHIT42.

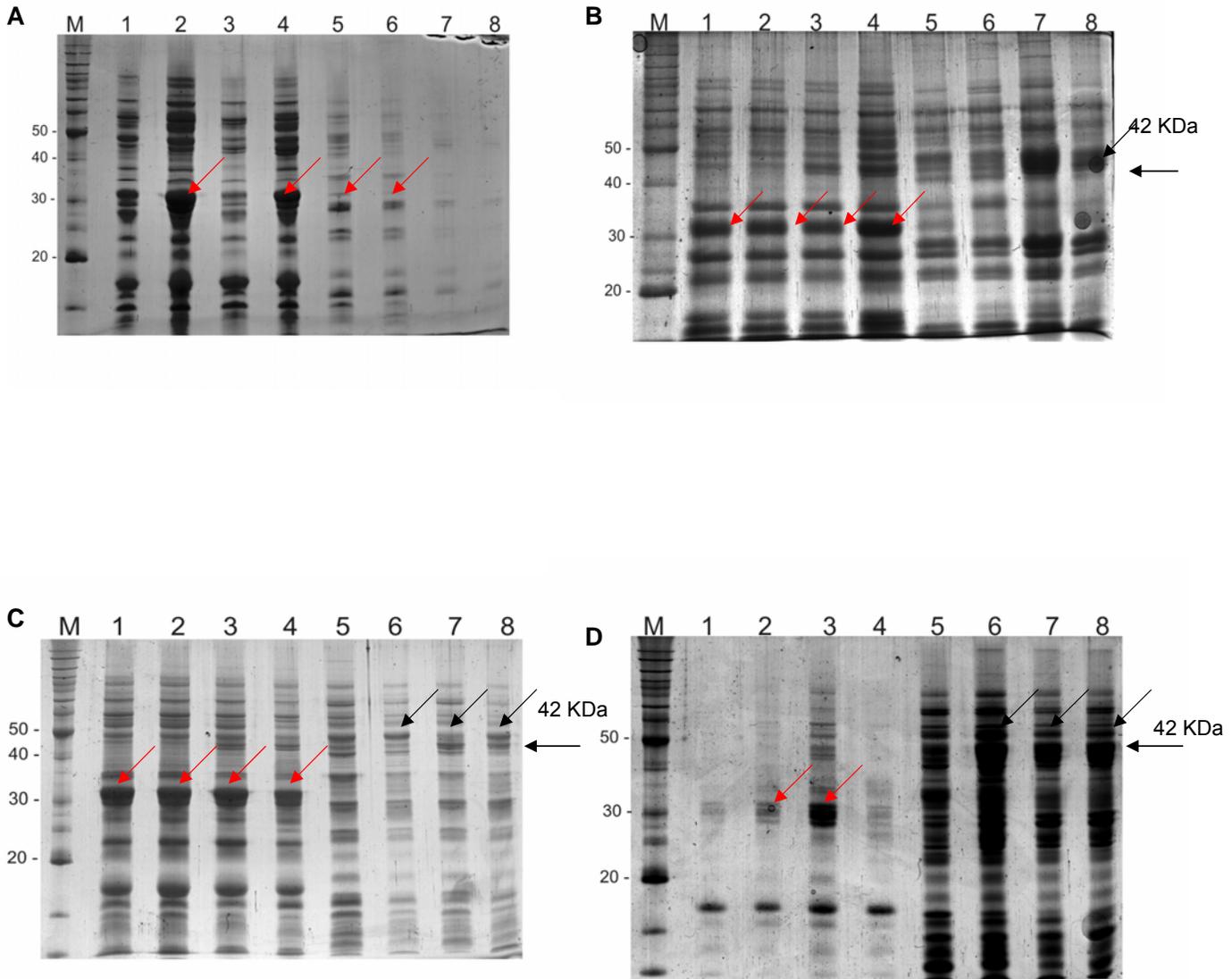


Figura 9 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% das proteínas presentes no sobrenadante de cultivo em diferentes tempos. (A) 72 horas (B) 96 horas (C) 120 horas e (D) 144 horas de cultivo. Canaletas: (M); (1) *M. anisopliae* selvagem em cultivo em cutícula 1% (2) TCHIT ANTI em cultivo em cutícula 1%; (3) TCHIT 1.2 em cultivo em cutícula 1%; (4) TCHIT 1.3 em cultivo em cutícula 1%; (5) *M. anisopliae* selvagem em cultivo em glicose 1%; (6) TCHIT ANTI em cultivo em glicose 1%; (7) TCHIT 1.2 em cultivo em glicose 1%; (8) TCHIT 1.3 em cultivo em glicose 1%.

4.3 - Determinação da atividade quitinolítica nos transformantes que superexpressam o gene *chit1* em cultivos com diferentes fontes de carbono

Com a finalidade de verificar a produção da endoquitinase (42KDa) nos transformantes (TCHIT1.2, TCHIT1.3 e TCHIT1ANTI) que superexpressam o gene *chit1* nas orientações senso e antisenso, a atividade de quitinase e a presença de açúcares redutores totais foram determinados em sobrenadantes de culturas.

M. anisopliae foi cultivado por seis dias em Meio de Cove adicionado de diferentes fontes de carbono (glicose 1% ou quitina cristalina 1% ou cutícula de *B. microplus* 1%). Os resultados da atividade específica de quitinase nos sobrenadantes das culturas estão mostrados na Figura 10.

Os resultados dos sobrenadantes das culturas adicionadas de cutícula de *B. microplus* 1% estão mostrados na Figura 10 A. A atividade quitinolítica nos sobrenadantes de cultura dos transformantes apresentou uma diferença significativa com relação à linhagem selvagem nos tempos de cultivo de 72 e 96 horas, não havendo diferenças significativas nos demais tempos. Houve um aumento significativo da atividade específica de quitinase, em torno de 2 vezes, para o transformante TCHIT 1.2 e de 2,5 vezes para o transformante TCHIT 1.3 (cultivos de 72 horas) e de 1,7 vezes para o transformante TCHIT 1.2 e TCHIT 1.3 (cultivos de 96 horas), não havendo diferenças significativas entre a linhagem selvagem e o transformante TCHIT1ANTI (Tabela 3 A). Observou-se níveis altos de atividade de quitinase nos tempos de 24 e 48 horas de cultivo, onde a partir de 72 horas a atividade permanece constante, mantendo até 144 horas de cultivo.

Na presença de quitina cristalina 1% (Figura 10 B) pudemos observar que nos cultivos de 24 e 72 horas ocorreram diferenças significativas na atividade quitinolítica nos sobrenadantes de cultura da linhagem selvagem (E6S2) e transformantes. Houve aumento significativo, em torno de 4,2 vezes, para o transformante TCHIT 1.2 e de 3,8 vezes para o transformante TCHIT 1.3 (cultivo de 24 horas) e de 4,6 vezes para o transformante TCHIT 1.2 e de 4,3 para o transformante TCHIT 1.3 (cultivo de 72 horas) (Tabela 3 B). Observa-se um aumento da atividade específica de quitinase a partir do terceiro dia de cultivo.

A condição de cultivo com glicose 1%, mostrada na Figura 10 C, que foi suplementada com o açúcar a cada 24 horas, determinou a repressão do sistema quitinolítico (MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004), o que facilitou a detecção da diferença de produção da quitinase nos transformantes para superexpressão da endoquitinase (42 KDa) em relação a linhagem selvagem. A linhagem selvagem possui apenas o gene *chit1* com seu promotor original que é reprimido por glicose 1% (MORAES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005). Já os transformantes apresentam uma cópia extra do gene *chit1* sob controle do promotor constitutivo *pef1 α* , que apresenta normalmente expressão constitutiva e não é reprimido pela presença da glicose, tendo, portanto uma maior expressão da atividade de quitinase nos sobrenadantes. A atividade quitinolítica nos sobrenadantes das culturas dos transformantes apresentou diferenças significativas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo. Houve um aumento significativo na atividade específica de quitinase, em torno de 2,2 vezes para o transformante TCHIT 1.2, e de 3,3 vezes para o transformante TCHIT 1.3 (cultivo de 48 horas), de 2,4 vezes para o transformante TCHIT 1.2 e de 3,2 para o transformante TCHIT 1.3 (cultivo de 72 horas) e de 2,4 para o transformante TCHIT 1.2 e de 2,6 para o transformante TCHIT 1.3 (cultivo de 96 horas). Não havendo diferenças significativas nos tempos de 120 e 144 horas de cultivo (Tabela 3 C).

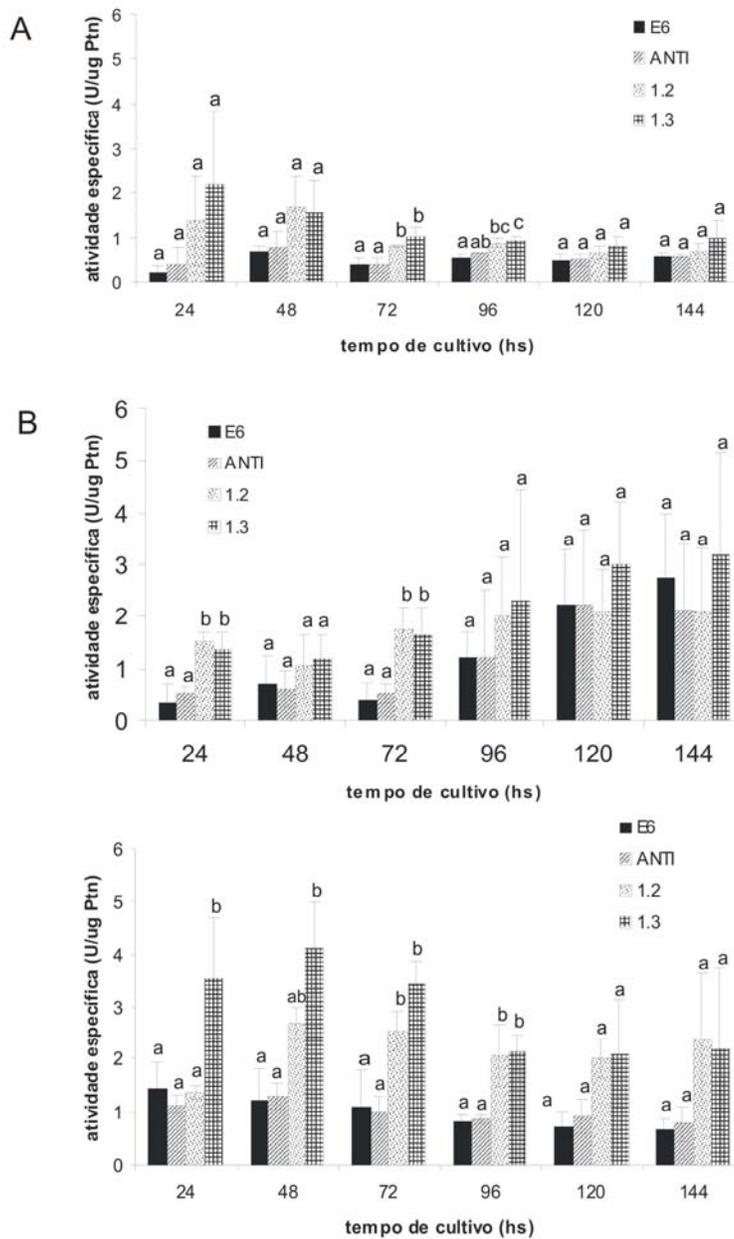


Figura 10 - **Atividade específica de quitinases em sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos.** (A) cultivo em cutícula de *B. microplus* 1%; (B) cultivo em quitina cristalina 1%; (C) cultivo em glicose 1%. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética. As médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre as linhagens para cada tempo a partir dos dados analisados pelo teste ANOVA – Tukey HSD ($\alpha \leq 0,05$).

Tabela 3 - Atividade de quitinase de *M. anisopliae* selvagem (E6S2) e dos transformantes superexpressando o gene *chit1* em cutícula 1% em diferentes tempos de cultivo.

Linhagens / Tempo de cultivo	Atividade específica (U/ug Ptn) em cutícula 1%					
	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs
E6S2	0,227 ± 0,18	0,696 ± 0,12	0,413 ± 0,14	0,540 ± 0,09	0,477 ± 0,14	0,583 ± 0,07
TCHITANTI	0,418 ± 0,36	0,789 ± 0,35	0,396 ± 0,16	0,658 ± 0,02	0,516 ± 0,13	0,596 ± 0,04
TCHI1.2	1,374 ± 1,01	1,665 ± 0,75	0,809 ± 0,03	0,894 ± 0,11	0,665 ± 0,14	0,697 ± 0,17
TCHIT1.3	2,187 ± 1,64	1,558 ± 0,75	1,054 ± 0,15	0,928 ± 0,10	0,811 ± 0,22	1,007 ± 0,36

Tabela 4- Atividade de quitinase de *M. anisopliae* selvagem (E6S2) e dos transformantes superexpressando o gene *chit1* em quitina cristalina 1% em diferentes fontes de carbono.

Linhagens / Tempo de cultivo	Atividade específica (U/ug Ptn) em quitina cristalina 1%					
	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs
E6S2	0,365 ± 0,32	0,717 ± 0,54	0,383 ± 0,35	1,225 ± 0,47	2,223 ± 1,05	2,735 ± 1,25
TCHITANTI	0,512 ± 0,12	0,614 ± 0,34	0,524 ± 0,18	1,203 ± 1,3	2,232 ± 1,43	2,143 ± 1,23
TCHI1.2	1,52 ± 0,17	1,047 ± 0,61	1,757 ± 0,43	2,004 ± 1,13	2,068 ± 0,85	2,070 ± 1,26
TCHIT1.3	1,38 ± 0,30	1,18 ± 0,47	1,649 ± 0,56	2,339 ± 2,0	3,015 ± 1,2	3,192 ± 1,9

Tabela 5- Atividade de quitinase de *M. anisopliae* selvagem (E6S2) e dos transformantes superexpressando o gene *chit1* em glicose 1% em diferentes fontes de carbono.

Linhagens / Tempo de cultivo	Atividade específica (U/ug Ptn) em glicose 1%					
	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs
E6S2	1,449 ± 0,5	1,233 ± 0,59	1,091 ± 0,68	0,808 ± 0,13	0,721 ± 0,28	0,644 ± 0,23
TCHITANTI	1,146 ± 0,18	1,283 ± 0,25	1,000 ± 0,29	0,872 ± 0,08	0,924 ± 0,31	0,775 ± 0,32
TCHI1.2	1,375 ± 0,13	2,692 ± 0,3	2,539 ± 0,37	2,078 ± 0,6	2,004 ± 0,38	2,387 ± 1,26
TCHIT1.3	3,536 ± 1,13	4,106 ± 0,88	3,441 ± 0,42	2,132 ± 0,35	2,095 ± 1,03	2,191 ± 1,54

Para verificar o consumo de açúcares redutores durante os seis dias de cultivo, foi realizada a determinação de açúcar redutor, utilizando-se do método do DNS (materiais e métodos). A quantidade de açúcares redutores foi analisada dos cultivos após a reposição dos açúcares, que ocorria a cada 24 horas. A Figura 11 mostra um aumento de açúcares redutores no decorrer dos dias de cultivo, demonstrando que sua presença mantinha o sistema reprimido (MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004).

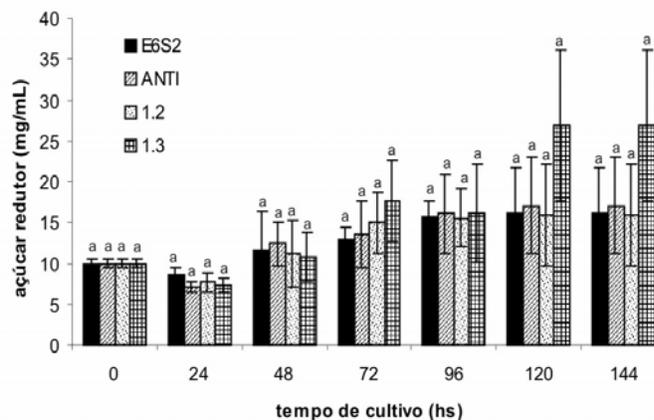


Figura 11 - **Determinação de açúcares redutores em cultivos de *M. anisopliae* em glicose 1%.** A cada 24 horas os açúcares foram repostos nas culturas. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética. As médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre as linhagens para cada tempo a partir dos dados analisados pelo teste ANOVA – Tukey HSD ($\alpha \leq 0,05$).

4.4 - Bioensaios: efeitos da superexpressão do gene *chit1* no processo de infecção do carrapato *Boophilus microplus*.

Para as análises da patogenicidade dos transformantes de *M. anisopliae*, comparadas à linhagem selvagem foram utilizadas teleóginas do carrapato *B. microplus* gentilmente cedidas pelo Dr. João Ricardo Martins (Lab. de Parasitologia (IPVDF)).

Os resultados do bioensaio (Figura 12) mostraram que a linhagem selvagem (E6S2) é altamente virulenta para as fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* (93%), como já mostrado no trabalho de ARRUDA (2005). Os transformantes TCHIT1.3 (91,11%) e TCHIT 1.2 (93,34%) também mostraram infecção massiva no segundo dia após a inoculação, tendo 100% de mortalidade dos carrapatos no terceiro dia após a inoculação.

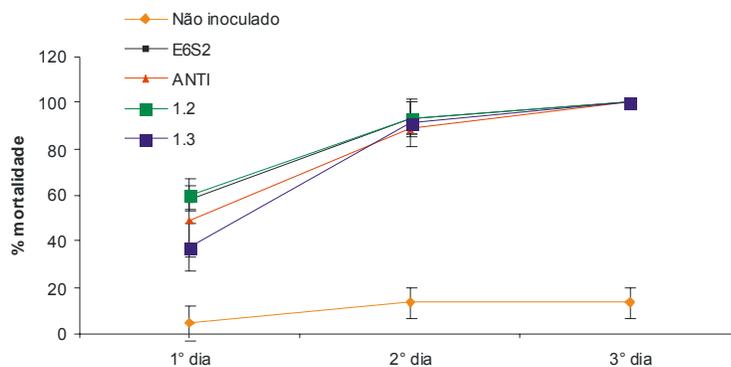


Figura 12 - Patogenicidade de *M. anisopliae* e dos transformantes que superexpressam o gene *chit1* em teleóginas de *Boophilus microplus* do 1º ao 3º dia de infecção.

Após a morte dos carrapatos, o fungo *M. anisopliae* selvagem e os transformantes foram re-isolados desses carrapatos para verificar se a construção dessas linhagens se mantinha estável. Esses fungos foram cultivados em Meio de Cove adicionado de glifosinato de amônio na concentração de 40 mg/mL onde todos se desenvolveram. Posteriormente foi extraído DNA e realizado PCR com os oligonucleotídeos #chit1R e #chit1F que flanqueiam os três íntrons do gene

chit1, permitindo a distinção entre a cópia genômica, que gera um amplicon de 472 pb e a cópia de cDNA, que gera um amplicon de 230 pb presente nas construções pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI (Figura 7, Painel B). Foi confirmada a presença da cópia do cDNA nos transformantes (TCHIT1ANTI, TCHIT1.2 e TCHIT1.3), confirmando a estabilidade das construções para superexpressão do gene *chit1* (Figura 13).

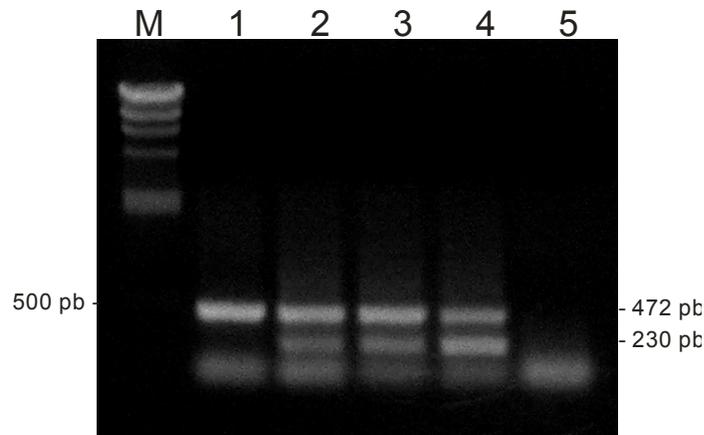


Figura 13 - **Análise de transformantes resistentes ao glifosinato de amônio quanto à presença do cDNA do gene *chit1* reisolados de *Boophilus microplus*.** Reação de amplificação utilizando os oligonucleotídeos *chit1F* e *chit1R*. O amplicon gerado a partir do gene *chit1* selvagem apresenta 472 pb e o amplicon gerado a partir do cDNA do gene *chit1* (construções pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI) apresenta 230 pb. Gel de agarose 0,8%. Canaletas: (M) marcador λ /HindIII; (1) DNA genômico de *M. anisopliae* selvagem (2) TCHIT ANTI; (3) TCHIT 1.2; (4) TCHIT 1.3; (5) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.5 - Análise do padrão de expressão do gene *chit1* em cultivos de *M. anisopliae* nos tempos de incubação de 48, 72 e 96 horas em glicose 1%

Foi utilizada a técnica de RT-PCR para analisar os níveis de transcritos do gene *chit1* (BOGO *et al.*, 1998) de *M. anisopliae* selvagem e dos transformantes que superexpressam esse gene (TCHITANTI, TCHIT1.2 e TCHIT1.3) Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene *chit1*. O micélio foi cultivado, nos tempos de 48, 72 e 96 horas em meio contendo nitrato como fonte de

nitrogênio e acrescido de glicose 1%, suplementada a cada 24 horas. O RNA foi extraído de micélio e as preparações foram tratadas com Dnase (Invitrogen) livre de RNase. A síntese de primeira fita de cDNA foi realizada e seguida das reações de PCR com *primers* específicos para o gene *chit1*. Como controle interno, para padronizar a quantidade de RNA de cada condição de cultivo, foram utilizadas a amplificação dos genes *β-tub* e *tef-1α* (fator de alongamento da tradução) de *M. anisopliae*, descrito como tendo expressão constitutiva (NAKAZATO *et al.*, 2006). Os *primers* utilizados nos experimentos foram projetados de modo a flanquear íntrons permitindo a identificação de amplicons gerados a partir da cópia genômica ou de mRNA para cada gene.

De acordo com os resultados da Figura 10 C, demonstram a atividade específica de quitinase em meio glicose 1%, nos tempos de 48, 72 e 96 horas de cultivo nos permitiu uma melhor observação da diferença de produção de quitinase nos transformantes para superexpressão da endoquitinase com relação à linhagem selvagem. A partir disso foram realizados experimentos de RT-PCR para analisar os níveis de transcritos do gene *chit1* nesses tempos de cultivo. A Fig. 14 A mostra o nível de transcritos do gene *chit1* de *M. anisopliae* em cultivos com glicose 1% em 48 horas. Observou-se que o transformante TCHIT 1.3 mostrou o maior nível de transcrição comparado aos demais, tendo os transformantes TCHITANTI e TCHIT 1.2 o mesmo nível de transcrição, mas com um maior nível quando comparado a linhagem selvagem, confirmando os dados de atividade enzimática (mostrados na Fig. 10 C).

O mesmo foi realizado no tempo de cultivo de 72 horas, mostrado na Figura 14 B. Observa-se que os transformantes TCHITANTI , TCHIT 1.2 e TCHIT 1.3 tiveram os maiores níveis de transcrição do gene *chit1* quando comparado a linhagem selvagem, confirmando os dados mostrados na Figura 10 C.

O RT-PCR do cultivo que durou 96 horas, mostrado na Figura 14 C, observa-se que há pouca diferença na expressão do transcrito na linhagem selvagem e TCHITANTI em relação aos transformantes TCHIT1.2 e TCHIT1.3, diferente do que foi visto no ensaio enzimático, Fig. 10 C, onde há diferença estatística entre eles.

GLICOSE 1%

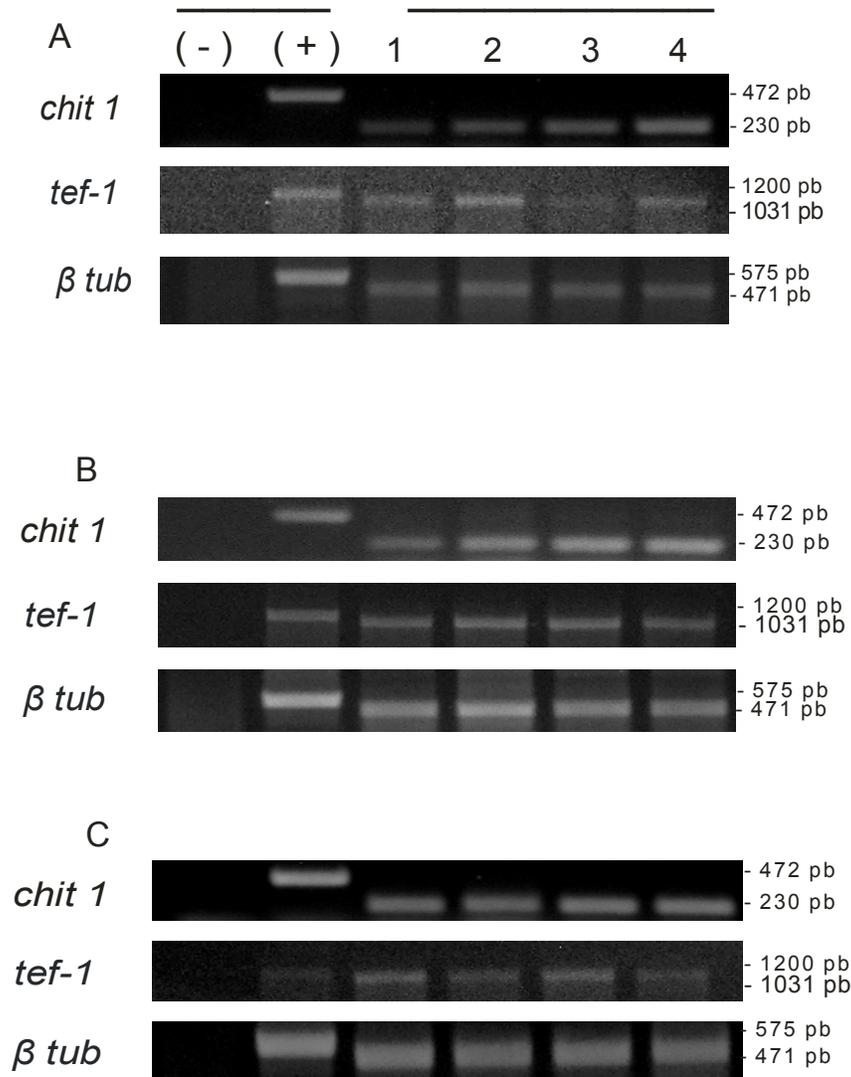


Figura 14 - Nível de transcritos do gene *chit1* de *M. anisopliae* em cultivos com glicose 1% incubados por 48, 72 e 96 horas. Gel de agarose 0,8% mostrando os produtos de reação de RT-PCR realizada com utilização de oligonucleotídeos específicos para os genes *chit, 1*, βtub e *tef-1 α* (controles internos). (A) 48 horas, (B) 72 horas e (C) 96 horas. As canaletas contêm respectivamente: (-) controle negativo da reação sem DNA molde ; (+)

controle positivo utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; (1) cDNA de *M. anisopliae* E6S2; (2) cDNA de TCHIT ANTI; (3) cDNA de TCHIT 1.2 e (4) cDNA de TCHIT 1.

4.6 – Análise da morfologia dos transformantes

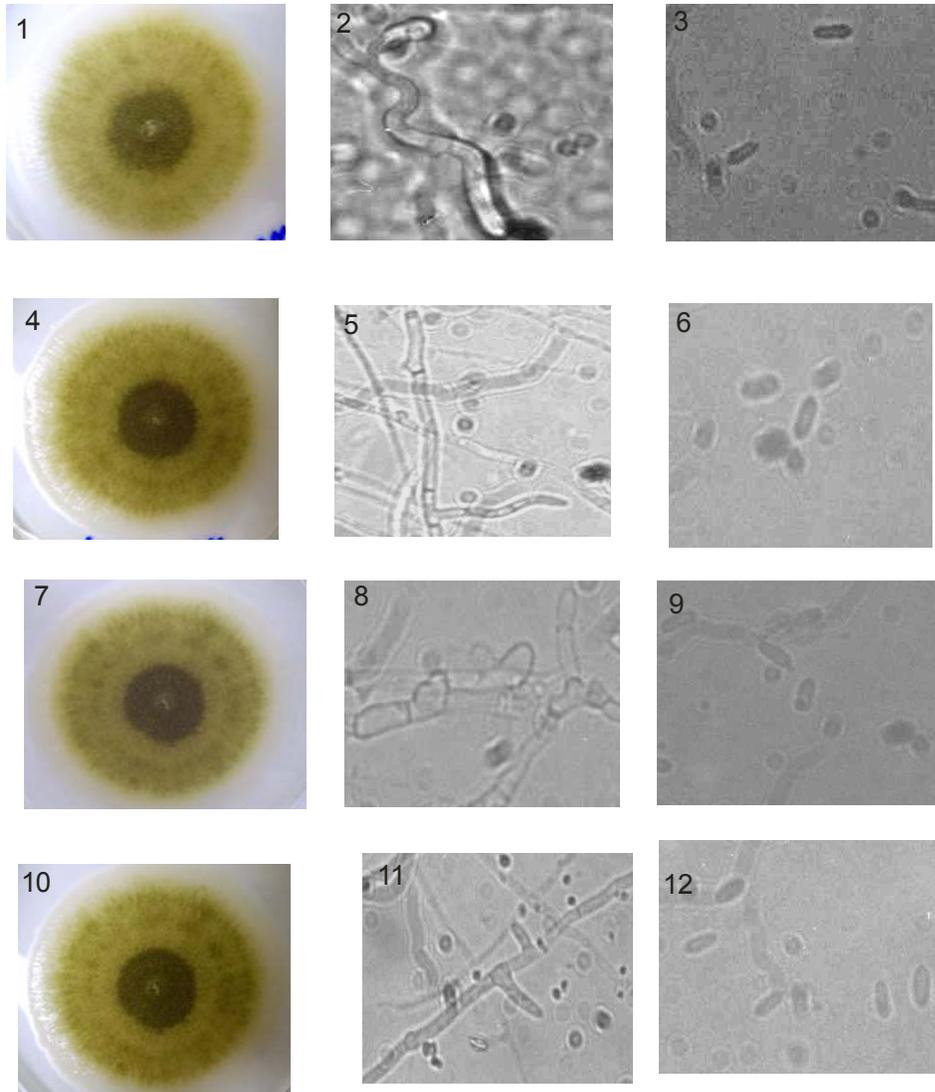


Figura 15- Morfologia da colônia, das hifas e dos conídios de *M. anisopliae* e os transformantes que superexpressam o gene *chit1* em meio Mc. Fotografias (x 100) (1-3): *M. anisopliae* selvagem; (4-6):TCHITANTI; (7-9): TCHIT 1.2 e (10-12): TCHIT 1.3.

M. anisopliae selvagem apresenta um micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, sobre os quais desenvolvem os conídios (normalmente uninucleados, cilindros e com dimensões variáveis), em colunas compactadas (Figura 15, fotografias 1, 2 e 3), cuja aderência ao hospedeiro varia de acordo com a linhagem do fungo (ARRUDA, 2005; ALVES, 1998).

A Figura 15 (Fotografias 1,4,7 e 10) mostra a morfologia da colônia de *M. anisopliae* selvagem e dos transformantes quando cultivados em placa de Petri, contendo Mc sólido, evidenciando que não ocorreram alterações na morfologia, tamanho e na coloração da colônia. Ainda a Figura 15 (Fotografias 2,5,8,11 e 3,6,9,12 respectivamente) mostra a morfologia das hifas e dos conídios por microscopia óptica (aumento 100 x). Todos os conídios apresentam o mesmo tamanho, a forma alongada característica do gênero. Portanto, não há diferença detectável na morfologia da linhagem selvagem com os transformantes. Os dados sugerem que não existe o envolvimento do gene *chit1* na morfologia do fungo.

5. DISCUSSÃO

Fungos filamentosos vêm sendo aplicados na agricultura, no controle de pragas e doenças de plantas, visando aumentar a velocidade do processo de infecção, diminuindo o intervalo de tempo existente entre a aplicação a campo do fungo biocontrolador e a morte das pragas. Mas a utilização de fungos entomopatogênicos tem sido restrita, devido à limitação no conhecimento da complexa interação fungo-hospedeiro. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o hospedeiro permite o conhecimento da natureza da patogenicidade, possibilitando o aumento na expressão de genes específicos relacionados à infectividade, diminuindo o tempo entre a aplicação do biopesticida e a morte do hospedeiro (ST LEGER *et al.*, 1996a; SCREEN *et al.*, 2001).

O processo de infecção dos hospedeiros pelos fungos é mais estudado em determinadas espécies, como *Metarhizium anisopliae*. Acredita-se que este fungo é capaz de infectar um largo espectro de hospedeiros, que apresentam diferenças na composição na cutícula (SHAH & PELL, 2003).

O entendimento dos mecanismos básicos do processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros tem permitido a proposição de alterações que tornam este sistema mais eficiente. A etapa de penetração é crítica no processo de infecção. A infecção ocorre por penetração direta através da cutícula do hospedeiro e envolve pressão mecânica, e a secreção de enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; BOGO *et al.*, 1998; GIMÉNEZ-PECCI *et al.*, 2002). Essa relação entre a produção de enzimas que degradam a cutícula com a patogenicidade vêm sendo alvo de muitos estudos. Alguns genes e enzimas têm sido caracterizados e investigados quanto a possível participação no processo de infecção e penetração do fungo *M. anisopliae* em seus hospedeiros (DUTRA *et al.*, 2004), dentre eles podemos destacar aqueles envolvidos com a degradação da quitina.

Para poder entender a função da endoquitinase CHIT42, codificada pelo gene *chit1* de *M. anisopliae*, BARATTO (2005) construiu linhagens alteradas no

gene *chit1* em ambas as orientações senso e antisenso sob regulação do promotor do gene *tef1 α* de *M. anisopliae*, utilizando o gene BAR como marca de seleção, que confere resistência ao fungicida glifosinato de amônio. A construção desses transformantes (TCHIT1ANTI, TCHIT1.1, TCHIT1.2, TCHIT1.3, TCHIT1.4, TCHIT1.5, TCHIT1.6) foi analisada em experimentos de PCR utilizando *primers* que confirmaram a presença dos plasmídeos pTEFCHIT1 e pCHITANTI integrados no genoma destes transformantes.

O sistema quitinolítico de *M. anisopliae* é regulado por um mecanismo de indução-repressão, em que produtos de degradação da quitina, incluindo NacGlc que induz tanto a síntese quanto à secreção de quitinases, enquanto a glicose é um repressor da síntese (BARRETO *et al.*, 2004). A concentração do monômero NacGlc também regula a síntese e a secreção das quitinases. Baixas concentrações de NacGlc (0,5%) são indutores, enquanto altas concentrações (1%) tem papel repressor (MOREIRA, 1998; MORAES *et al.*, 2003, BARRETO *et al.*, 2004) e glicose age como repressor (BOGO *et al.*, 1998).

Nesse trabalho, os transformantes e *M. anisopliae* selvagem foram analisados em cultivos com diferentes fontes de carbono, em condições de indução (cutícula de *B. microplus* 1% e quitina cristalina 1%) ou repressão (glicose 1%) da expressão da endoquitinase CHIT42, em diferentes tempos. Muitas enzimas que degradam a cutícula tem sido purificadas de fungos entomopatogênicos (ST LEGER *et al.*, 1986b), e sua indução em culturas contendo quitina são estudadas, e sabe-se que as proteases são produzidas primeiro, antes de 24 horas, enquanto que as quitinases e lipases são produzidas depois, de 4 a 5 dias (ST LEGER *et al.*, 1986a; ST LEGER *et al.*, 1991b).

O perfil das proteínas totais em sobrenadantes de culturas mostrou uma grande variação em tamanho e intensidade de bandas nas duas condições analisadas. Devido a isso, é possível observar a presença de algumas quitinases nas amostras. Bandas correspondentes possivelmente às quitinases de 30, 45 e 42 kDa, já relatadas (ST. LEGER *et al.*, 1991A; PINTO *et al.*, 1997; BARATTO *et al.*, 2006) estão fortemente representadas, principalmente a de 30 kDa.

Em relação a atividade de quitinases, observou-se que até o terceiro dia de cultivo ocorre a maior atividade específica de quitinase em meio adicionado de glicose 1%, mas a partir do quarto dia, a atividade específica de quitinase foi maior em meio adicionado de quitina cristalina 1%, não havendo diferença significativa da linhagem selvagem com as linhagens transformantes. Esses resultados concordam com os resultados publicados por PINTO *et al.* (1997), onde foram observados maiores níveis da atividade de quitinase em cultivos com quitina cristalina 1% comparado com glicose 1%, após o quarto dia de cultivo, com maiores atividades após 144 horas de incubação.

Nossos resultados mostram que em meio contendo quitina como fonte de carbono, a atividade específica da quitinase vai aumentando com o decorrer do tempo de cultivo, principalmente após o quarto dia de cultivo.

Para verificar o consumo de açúcares nos sobrenadantes das condições de cultivo em glicose 1%, foi realizada a determinação de açúcar redutor, para certificar-se que o sistema quitinolítico ficaria reprimido com a presença de glicose. A suplementação de glicose a cada 24 horas foi importante para diferenciar a atividade de quitinase dos transformantes para superexpressão da quitina CHIT42 em relação à linhagem selvagem. Os transformantes possuem cópias extras do gene *chit1* sob o controle do promotor *Ptef1- α* , que não é reprimido pela presença da glicose, havendo uma maior expressão e atividade de quitinase nos sobrenadantes, ao contrário da linhagem selvagem que possui apenas o gene *chit1* com seu promotor original, reprimido na presença de glicose. Os altos níveis de glicose após a reposição de açúcares mostram que o sistema continua reprimido, já que a glicose é um repressor da síntese quanto à secreção de quitinases (MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). A glicose está disponibilizada em níveis mais elevados do que aqueles necessários para o consumo do fungo. Se não ocorre a adição exógena de glicose no início o sistema está reprimido, mas à medida que o fungo se desenvolve a glicose é consumida até que a concentração de glicose diminui tanto que o sistema deixa de ser reprimido.

A partir desses resultados, foi realizada RT-PCR com o objetivo de verificar o nível de transcrição do gene *chit1*, onde se observou melhor a diferença entre a linhagem selvagem e os transformantes, em cultivos de 48, 72 e 96 horas em meio com glicose 1% como fonte de carbono. No presente trabalho pudemos observar que o gene *chit1* teve um aumento no nível de transcrição nos transformantes comparado a linhagem selvagem, nos três tempos estudados, confirmando os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos. O transformante TCHITANTI, onde a ORF *chit1* está invertida em relação ao promotor *tef1-α* não apresentou uma diminuição na atividade da quitinase em relação ao selvagem como seria esperado. Nesse caso, o transcrito do transformante iria parear com o transcrito da cópia selvagem e anularia a produção de *chit1* selvagem.

Dessa forma, depois de realizados os ensaios enzimáticos com *M. anisopliae* selvagem e os transformantes, para verificar a participação do produto do gene *chit1* no processo de infecção foram realizados bioensaios com o carrapato *Boophilus microplus*. Nossos resultados mostraram 100% de mortalidade ao terceiro dia após a inoculação para a linhagem selvagem. O mesmo aconteceu com as linhagens transformantes, que também mostraram 100% de mortalidade dos carrapatos no terceiro dia após a inoculação. *M. anisopliae* selvagem teve sua patogenicidade avaliada anteriormente. FRAZZON *et al.*, 2000 relataram uma taxa de mortalidade de 50% em 5 dias para *M. anisopliae* E6, e ARRUDA (2005) testando a patogenicidade de vários isolados de *M. anisopliae* observou uma alta taxa de mortalidade, de 98% aos 4 dias após a inoculação para o isolado E6. Portanto, a superexpressão do gene *chit1* não aumentou a virulência do fungo contra o carrapato *B. microplus*, apesar da maior produção de quitinase observado nos ensaios enzimáticos (Figura 10). SCREEN *et al.* 2001 também relataram resultados similares, onde transformantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* superexpressando o gene *chit1* de *M. anisopliae* var. *acridum* não alterou a patogenicidade contra *Manduca sexta*, mostrando o não envolvimento de quitinases na virulência. Por outro lado, a superexpressão do gene *Bchit1* de *Beauveria bassiana*, que codifica uma quitinase de 33 KDa aumentou a virulência de *B. bassiana* contra um pulgão (FANG *et al.*, 2005),

mostrando que as quitinases podem estar envolvidas na patogenicidade, porém para melhor elucidar as relações entre quitinases e a virulência de insetos-fungos, experimentos de superexpressão precisam ser feitos com outros genes de quitinases.

6. CONCLUSÕES

1 - Os transformantes para superexpressão do gene *chit1* foram confirmados quanto à construção realizada por BARATTO (2005).

2 - Ocorre um aumento na expressão da endoquitinase nos transformantes (TCHIT1.2 e TCHIT 1.3) em relação à linhagem selvagem. Em meio adicionado de cutícula de *B. microplus* 1%, a diferença foi significativa nos tempos de 72 e 96 horas de cultivo. Em meio adicionado de quitina cristalina 1%, a diferença entre os transformantes foi significativa nos tempos de 24 e 72 horas e em meio adicionado de cutícula, houve diferença nos tempos de cultivo de 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo. Portanto, as construções para superexpressão são funcionais, ou seja, os transformantes produzem mais quitinase como esperado. O transformante TCHITANTI, não apresentou uma diminuição na atividade da quitinase em relação ao selvagem como seria esperado, já que nesse transformante a cópia antisense anularia a tradução de *chit1* selvagem.

3- Não foi observada diferença no efeito da superexpressão e na construção antisense no processo de infecção no carrapato *B. microplus*, havendo 100% de mortalidade três dias após a infecção comparável a linhagem selvagem.

4 - Não foram observadas diferenças na morfologia das colônias, das hifas e dos conídios dos transformantes que superexpressam o gene *chit1* em comparação a linhagem selvagem.

5 – Mais estudos precisam ser realizados, mas dados preliminares demonstram a não participação da proteína codificada pelo gene *chit1* de *M. anisopliae* no processo de infecção no carrapato *B. microplus*, não havendo o aumento de sua

virulência, apesar de maior produção de quitinases nos transformantes que superexpressam esse gene.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150: 2029-2035.
- ALVES, S. B. (1998) Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz, 340p.
- ARRUDA, W. (2005) Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Tese de doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ARRUDA, W; LUBECK, I.; SCHRANK, A. e VAINSTEIN, M.H. (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 37: 231–244
- BARATTO, C. M.; DUTRA, V.; BOLDO, J. T.; LEIRIA, L. B.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. (2006) Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* gene ([DQ011663](#)) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current Microbiology*, 53:217-221.
- BARATTO, C. M. (2005) Caracterização de genes de quitinases do entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae*. Tese de doutorado.

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- BARATTO, C. M.; SILVA, M. V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L.; SCHRNAK, I. S.; VAINSTAIN, M. H. & SCHRANK, A. (2003) Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, 49(11) : 723-728.
- BARRETO, C. C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr. Microbiol.*, 48 : 102-107.
- BEYS SILVA, W.O.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2005) Production and extraction of a lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 40:321-326.
- BIDOCHKA, M. J. & KHACHATOURIANS, G. G. (1988) Hemocytic defense response to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Entomology Experimental Applied*, 45:151-156.
- BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER; ROBERTS, D. W. (1997) Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171 : 213 - 224.
- BITTENCOURT, S. E. T.; CASTRO, L. A.; FARIAS, S. E.; BAO, S. N.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2004) Purification and ultrastructural localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. *Res. Microbiol.*, 155 : 681-687.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA,E.J.; PERALVA, S.L.F.S. e REIS, R.C.S. (1999) Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1979) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapatos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari:Ixodidae). R. Bras. Med Vet. 21:78-82. BRADY, B.L. Fungi as parasites of insects and mites. Biocont. N. Informat., 2:281-29, 1981.

BOGO, M. R., ROTA, C. A, PINTO JR, H., OCAMPOS, M., CORRÊA, C. T., VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. *Curr. Microbiol.*, 37 : 221-225.

BRADFORD, M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72 : 248-254.

BLACKWELL, J. (1988) Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Methods Enzymol.*, 161 : 435-442.

CABIB, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol.*, 59 :101.

CARLSON, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2 : 202-207.

CHARNLEY, A. K. (1984) Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: ANDERSON, J. M., RAYNER, A. D.

- M., & WALTON, D.W.H. eds. *Invertebrate-Microbiology Interactions*. 6:229-270.
- CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. (1996) New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiology*, 4(5):197 - 203.
- CORREIA, A. C. B., FIORIN, A. C., MONTEIRO, A. C. & VERÍSSIMO, C. J. (1998) Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in *Sabled cattle*. *J. Invertebr. Pathol.*, 71 : 189-191.
- DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. (2005) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25: 1 – 10.
- DRIVER, F., MILNER, R. J. & TRUEMAN, J. W. H. (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.*, 104 : 134-150.
- DUO-CHUAN, L. (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161:345-360.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology*, 155 245 – 251.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, L.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, JJ.; YANG, X.; ZHANG, Y. AND PEI, Y. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene

Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and environmental microbiology*, 71: 363–370

FLACH, J., PILET, P. E., JOLLES, P. (1992) What's new in chitinase research? *Experientia*, 48 : 90-96.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A.P.; BARATTO, C.M.; KOGLER, V.; DA SILVA, M.V.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H. e SCHRANK, A. (2001) Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 23:32-37.

FRAZZON, A. P. G., VAZ JR, I. S., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* to control the tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94 : 117-125.

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

GIMÉNEZ-PECCI, M. L. P.; BOGO, M. R.; SANTI, L. KRIGER DE MORAES, C.; CORRÊA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. (2002) Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, 45: 334 - 339.

GOODAY, G.H.; ZHU, W.Y. e DONNELL, R.W. (1992) What are roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol. Lett.* 100:387-392.

- HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; LORITO, M.; BROADWAY, R.M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C. e TRONSMO, A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*. 83:313-318.
- HERRERA-ESTRELLA, A.; CHER, H. (1999) Chitinases in biological control. *Chitin and Chitinases*. 171-184.
- HOELL, I.A.; KLEMSDAL, S.S.; VAAJE-KOLSTAD,G.; HORN,S.J. & EIJSINK, V.G.H. (2005) Overexpression and characterization of novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. *Biochimica et Biophysica acta*, 1748: 180-190.
- ILMEN, M.; THRANE, C. PENTILLA, M. (1996) The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant. *Mol. Gen. Genet.* 251:451-460.
- KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. (1998) Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *FEMS: Microbiology Letters*, 165: 267 - 271.
- KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. (1999) Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 276 - 281.
- KANZOK, S.M. & JACOBS-LORENA, M. (2006) Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *TRENDS Parasitology.*, 22: 49-51.

- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- LI, D.C. ;ZHANG, S. H.; LIU, K.Q.; LU, J. (2004) Purification and characterization of a chitinase from the mycoparasitic fungus *Trichothecium roseum*. *J.Gen. Appl. Microbiol.* 50:35-39.
- LIMÓN, M.C.; MARGOLLES-CLARK, E.; BENÍTEZ, T.; PENTTILA, M. (2001) Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology Letters*, 198:57-63.
- LUNA, A.L. (1985) Características citológicas e genética de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985. 260f. Tese (Doutorado), UFRJ.
- MERZENDORFER, H. & ZIMOCH, L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology* 206:4393-4412.
- MILLER, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426 - 428, 1959.
- MILNER, R. J. (2000) Current status of *Metarhizium anisopliae* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol*, 21 (2): 47 – 50.
- MORAES, C. K.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.*, 46 : 205–210.

- MOREIRA, C. A. (1998) Regulação da secreção de proteínas do entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, D.F.
- NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BROETTO, L.; STAATS, C.C.; VAINSTEIN, M.H. E SCHRANK, A. (2006) Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef1 α* homologous promoter. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 72(3):521-528.
- PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 473 – 483.
- PINTO, A.S.; BARRETO, C.C.; SCHRANK, A.; ULCHOA, C.J.; VAINSTEIN, M.H. (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.*, 43:322-327.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M.A., KUYVENHOVEN, A., SOEDE, R.D.M., POUWELS, P.H. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. (1990) Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93 : 101-109.
- REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 217: 959 - 967.
- SAHAI, A.S. and MANOCHA, M.S. (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and parasite interaction. *FEMS microbial Rev.* 11:317-338.

- SAMBROOK, J. & RUSSEL. D. W. (2001) Molecular cloning: a Laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: CSHL.
- SCREEN, S. E.; HU, H. & ST. LEGER, R. J. (2001) Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78 : 260–266.
- SCREEN, S. E.; BAILEY, A.; CHARNLEY, K.; COOPER, R.; CLARKSON, N.J. (1998) Isolation of a nitrogen response regulator gene (*nrr1*) from *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 221(1):17-24.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 413 – 423.
- SILVA, M.V.; SANTI, L.; STAATS, C., C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology* , 56: 382 - 392.
- SILVA, M.V. (2004) Estudo de uma quitinase bifuncional (CHIT30) do fungo biocontrolador *Metarhizium anisopliae*. Tese de doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SMITH, R. J.; PEKRUL, S. & GRULA, E. A. (1981) Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 38:335-344.

- SMITH, R. J. & GRULA, E. A. (1983) Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *Journal Invertebrate Pathology*, 42:319-326.
- TULLOCH, H. (1976) The Genus *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66 : 407-411.
- STAATS, C.C.; SILVA, M.S.N.; PINTO, P.M.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2004) The *Metarhizium anisopliae* trp1 gene: cloning and regulatory analysis. *Curr. Microbiology*, 49:66-70.
- ST. LEGER R. J., CHARLEY, A. K. AND COOPER, R. M. (1986a) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes of insect culture. *J. Invertebr. Pathol.*, 47 : 295-302.
- ST. LEGER R. J., CHARLEY, A. K. AND COOPER, R. M. (1986b) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 48 : 85-95.
- ST. LEGER, R. J., DURRANDS, P. K., CHARNLEY, A. K. (1988) Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 58 : 415-426.
- ST. LEGER, R.J.; GOETTEL, M. S.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C.(1991a) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58:168 –17.

- ST. LEGER, R. J., COOPER, R. M., CHARNLEY, A. K. (1991b) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 58 : 415-426.
- ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C. & ROBERTS, D. W. (1993) Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isoenzymes. *J. Invertebr. Pathol.*, 61: 81- 84.
- ST. LEGER. R.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. (1996a) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the Nacional Academy of Science USA*, 93: 6349 – 6354.
- ST. LEGER, R. J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M. J., RIZZO, N. W., ROBERTS, D. W. (1996b) Characterization and ultrastructura localization of chitinase from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(3) : 907-912.
- ST. LEGER, R. J. & JOSHI, L. (1997) The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology* (Lacey, L., Ed.). p. 367-394. Academic Press, New York.
- TAKAYA, N., YAMAZAKI, D., HORIUCHI, H., OHTA, A. & TAKAGI, M. (1998) Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 62(1) : 60-65.

- THOMPSON, C.; MOVVA, N. R.; TIZARD, R.; CRAMEI, R.; DAVIES, J. E.; LAUWEREYS, M & BOTTERMAN, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygrosopicus*. *EMBO J.*, 6(9) : 2519 – 2523.
- THOMPSON, S.E.; SMITH, M; WILKINSON, M.C. & PEEK, K. (2001) Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *Applied Environmental Microbiology*, 67 (9): 4001-4008.
- TRUDEL, J. & ASSELIN, A. (1989) Detection of chitinase activity after polyacrilamide gel eletrophoresis. *Anal. Biochem.* 178: 362-366.
- TULLOCH, H. (1976) The Genus *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66 : 407-411.
- ULHOA, C. J. & PEDEERBY, J. R. (1991) Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.*, 37 : 2163-2169.
- ZHIOUA, E., BROWING, M., JONHSON, P.W., GINSESBERG, H.S. & LEBRUM, R.A (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetos) to *Ixodes scapularum* (Acari: Ixididae). *J. Parasitol.*, 83(5) : 815-818.