

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

Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* que codificam quitinases no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Dissertação de Mestrado

LENISE PICHSENMEISTER PALMA

Porto Alegre, 2006.

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

Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* que codificam quitinases no 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.

LENISE PICHSENMEISTER PALMA

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Co-orientadora: Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2006.

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

Aos meus Orientadores, Dr. Augusto Schrank e Dra. Marilene Henning Vainstein pela oportunidade, paciência e confiança.

À comissão de acompanhamento, Dr. Giancarlo Pasquali e Dra. Célia Soares.

À Dra. Irene Schrank pela revisão desta dissertação.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao grupo de pesquisa da Dra. Célia Carlini do LAPROTOX (Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia, UFRGS), principalmente à aluna Fernanda Stanisçuaski, por cederem os insetos utilizados nos experimentos.

Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), por cederem os carrapatos utilizados nos experimentos.

Aos colegas dos laboratórios 217, 220 e 222 pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos e colegas Charley, Juliano, Broetto, Ângela, Lis, Lucélia, Walter, Livia e Juliana, pelo ótimo convívio e aprendizado.

Às minhas colegas e amigas Ana Carolina, Irina, Tatiana e Carolina, pela amizade e realização dos ensaios enzimáticos.

Às amigas Roberta, Fernanda S., Fernanda B e Ana Paula, pela amizade.

Aos funcionários do Centro e Biotecnologia.

À Helga, Arno, Karina e Rafael pelo amor e entusiasmo.

Ao Marcelo pelo companherismo, motivação e amor.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente ao Centro de Biotecnologia.

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

SUMÁRIO

Listas de abreviaturas, símbolos e unidades	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
1. Introdução	01
1.1 O fungo filamentoso <i>Metarhizium anisopliae</i>	01
1.2 Mecanismos de infecção de fungos entomopatogênicos	02
1.3 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> e o controle biológico	10
1.4 O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	13
1.5 O percevejo manchador de fibra de algodão <i>Dysdercus peruvianus</i>	15
1.6 Quitina e quitinases	17
1.6.1 Quitinases descritas em <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
1.6.2 Genes de quitinases isolados de <i>Metarhizium</i>	23
1.6.3 Mecanismos de regulação de quitinases	25
2. Objetivos	28
2.1 Geral	28
2.2 Específicos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1 Microrganismos	29
3.1.1 Linhagem de <i>M. anisopliae</i>	29
3.1.2 Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i>	29
3.2 Meios de Cultivo e manutenção de <i>M. anisopliae</i>	29
3.2.1 Meio LB (Luria-Bertani)	30
3.2.2 Meio de Cove Completo (MCC)	30
3.2.3 Meio Mínimo	30
3.3 Soluções e Tampões	31

3.3.1	Soluções para suspensão de esporos e cultivo de <i>M. anisopliae</i>	31
3.3.1.1	Tween 80	31
3.3.1.2	Solução de Sais	31
3.3.1.3	Solução de Elementos Traços	31
3.3.1.4	Solução de Glicose	31
3.3.1.5	Solução de N-acetilglicosamina	32
3.3.2	Soluções e tampões para a extração de ácidos nucleicos de <i>M. anisopliae</i>	32
3.3.2.1	Tampão de extração de DNA	32
3.3.2.2	Fenol	32
3.3.2.3	Fenol-clorofórmio	32
3.3.2.4	Clorofórmio-álcool isoamílico	32
3.3.2.5	TE	32
3.3.2.6	Tampão de lise	33
3.3.2.7	Cloreto de Lítio	33
3.3.2.8	Água DEPC	33
3.3.2.9	Solução de Acetato de sódio	33
3.3.3	Soluções e tampões para análise de ácidos nucleicos por eletroforese em gel de agarose	33
3.3.3.1	TAE 1x	33
3.3.3.2	TEB	34
3.3.3.3	Solução de brometo de etídio	34
3.3.3.4	Tampão de amostra para gel de agarose	34
2.2.4	Tampões e soluções para ensaios enzimáticos	34
3.3.4.1	Quitina Coloidal	34
3.3.4.2	Tampão acetato	34
3.2.4.3	Solução de ácido bórico	35
3.3.4.4	Solução DMAB (p-Dimetilaminobenzaldeído) 10 X	35
3.3.4.5	Solução de DNS (Ácido 3,5-dinitrossalicílico)	35
3.4	Cultivos de <i>M. anisopliae</i>	35
3.4.1	Cultivo de <i>M. anisopliae</i> em meio líquido	35

3.4.2	Cultivo de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono ou substratos complexos	36
3.5	Preparação de cutículas	36
3.6	Manipulação de ácidos nucléicos	37
3.6.1	Extração de DNA genômico de <i>M. anisopliae</i>	37
3.6.2	Extração de RNA de <i>M. anisopliae</i>	38
3.6.3	Eletroforese em gel de agarose	38
3.6.4	Amplificação de DNA pela técnica de PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	39
3.6.4.1	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos Chit1F e Chit1R e Chi2F e Chi2R	40
3.6.4.2	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos Chit3F e Chit3R	40
3.6.4.3	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos Tef1F e Tef1R	40
3.6.5	Oligonucleotídeos	41
3.6.6	Tratamento de RNA com enzima Dnase I	41
3.6.7	Amplificação por RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>)	42
3.7	Ensaio enzimáticos	42
3.7.1	Quantificação de proteínas	42
3.7.2	Ensaio enzimático para a detecção de quitinase	43
3.7.3	Determinação de açúcar redutor	43
4.	Resultados	45
4.1	Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> em cultivos de <i>M. anisopliae</i>	45
4.1.1	Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> em cultivos contendo glicose 1%	47
4.1.2	Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> em cultivos contendo N-acetilglicosamina 0,25%	49
4.1.3	Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> em cultivos contendo N-acetilglicosamina 1%	50

4.1.4	Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> em cultivos contendo quitina cristalina 1%	52
4.1.5	Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> em cultivos contendo cutícula de <i>Boophilus microplus</i> 1%	53
4.1.6	Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> em cultivos com cutícula de <i>Dysdercus peruvianus</i> 1%	54
4.2	Análise da produção de quitinases e do consumo de açúcares em sobrenadantes de culturas com diferentes substratos	56
5.	Discussão	59
6.	Conclusões	68
7.	Perspectivas	70
8.	Referências Bibliográficas	71

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 etilenodiaminotetraacético
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
g	Gramma, aceleração da gravidade
h	Hora
kDa	Quilidaltos
L	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MCC	Meio de Cove completo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NacGlc	N-acetilglicosamina
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
pH	Potencial de hidrogênio
RDA	<i>Representational difference analysis</i>
RNA	Ácido ribonucléico
p/v	Peso por volume
pmol/v	Picomol por volume

rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TE	Tampão Tris-HCl/EDTA
Tris	2 - amino - 2 - hidroximetilpropano - 1,3 - diol
Tween	Polisorbitano
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Radiação ultravioleta
U/ μ L	Unidade por microlitro
V	Voltz
v/v	Volume por volume
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Características morfológicas da colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> .	02
Figura 2.	Etapas do processo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Boophilus microplus</i> .	09
Figura 3.	Teleógina de <i>B. microplus</i> em processo de oviposição.	15
Figura 4.	Estágios de adulto e ninfa de <i>Dysdercus peruvianus</i> .	17
Figura 5.	Estrutura química da quitina.	18
Figura 6.	Representação esquemática do mecanismo de ação das quitinases.	20
Figura 7.	Mapa físico da região codificante dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> , <i>chi3</i> e <i>tef-1α</i> de <i>M. anisopliae</i> .	47
Figura 8.	Nível de transcritos dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> de <i>M. anisopliae</i> em cultivos com glicose 1%.	48
Figura 9.	Nível de transcritos dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> de <i>M. anisopliae</i> em cultivos com N-acetilglicosamina 0,25%.	50
Figura 10.	Nível de transcritos dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> de <i>M. anisopliae</i> em cultivos com N-acetilglicosamina 1%.	51
Figura 11.	Nível de transcritos dos genes <i>chi2</i> e <i>chi3</i> de <i>M. anisopliae</i> em cultivos com quitina cristalina 1%.	52

Figura 12. Nível de transcritos dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> de <i>M. anisopliae</i> em cultivos com cutícula de <i>Boophilus microplus</i> 1%.	54
Figura 13. Nível de transcritos dos genes <i>chit1</i> , <i>chi2</i> e <i>chi3</i> de <i>M. anisopliae</i> em cultivos com cutícula de <i>Dysdercus peruvianus</i> 1%.	55
Figura 14. Atividade específica de quitinases em sobrenadantes de cultivos de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos.	57
Figura 15. Determinação de açúcares redutores em cultivos de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Componentes das reações de amplificação de DNA por PCR.	40
Tabela 2.	Oligonucleotídeos utilizados.	41
Tabela 3.	Tamanho dos amplicons gerados para cada um dos genes <i>chit</i> e <i>tef-1α</i> de <i>M. anisopliae</i> , para as cópias genômica e de cDNA.	46

RESUMO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um agente biocontrolador capaz de infectar uma grande variedade de pragas. O controle biológico de carrapatos e insetos tem sido empregado principalmente porque, ao contrário dos pesticidas químicos, não agredem o meio ambiente, não apresentam toxidez e normalmente não induzem resistência nos hospedeiros. A penetração de *M. anisopliae* em seus hospedeiros ocorre de forma ativa sendo que a cutícula constitui a principal barreira. A quitina é um dos componentes majoritários da cutícula de artrópodes, e os fungos entomopatogênicos secretam uma grande quantidade de quitinases. Alguns genes de quitinases de *M. anisopliae* têm sido estudados pelo nosso grupo de pesquisa, dentre eles estão os genes *chit1*, *chi2* e *chi3*. Objetivando contribuir na elucidação da função dos genes que codificam quitinases na biologia de *M. anisopliae*, analisamos o padrão de transcrição dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em diferentes tempos e condições de cultivo, assim como acompanhamos a produção de quitinases e o consumo de açúcares nos sobrenadantes destes cultivos. Foram realizados cultivos com a adição de diferentes fontes de carbono: glicose 1%; N-acetilglicosamina (NacGlc) 0,25% e 1%; quitina cristalina 1%; cutícula de carrapato *Boophilus microplus* 1% e cutícula de *Dysdercus peruvianus*; nos seguintes tempos de cultivo: 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 e 72 horas. Para analisar os níveis de transcritos dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* da linhagem E₆, foi utilizada a metodologia de RT-PCR, tendo como controle interno da reação e da quantidade de RNA a amplificação do gene *tef-1α* de *M. anisopliae*, descrito como tendo expressão constitutiva. O gene *chit1*, em todas as fontes de carbono analisadas, apresentou aumento da transcrição desde o tempo inicial dos cultivos, aumentando, na maioria das vezes, a partir de 40 horas de cultivo. Para os genes *chi2* e *chi3*, foi observada a presença de transcritos parcialmente processados, além dos transcritos completamente processados. O perfil de transcrição observado para o gene *chi2* mostrou-se variável nas diferentes fontes de carbono. Os transcritos apresentaram aumento gradativo com o aumento do tempo de cultivo, com exceção dos cultivos em glicose. Em relação

ao gene *chi3*, com exceção dos cultivos em quitina cristalina, todas as condições apresentam as duas espécies de transcrito, completamente e parcialmente processados. O perfil de transcrição observado para o gene *chi3* é muito variado sugerindo uma regulação complexa.

ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is a biological control agent that infects a variety of plagues. The biological control of ticks and insects has been used to overcome the deleterious effects of chemical pesticides. The biological control produce less effects to the environment, has low toxicity and normally does not induce host resistance. *M. anisopliae* penetrates its hosts actively through the cuticle which consists the main barrier to infection. Chitin is one of the main components of arthropod cuticle and, the entomopathogenic fungi secret large amounts of chitinases. Some chitinase genes of *M. anisopliae* have been studied by our group; amongst them are *chit1*, *chi2* and *chi3* genes. In order to contribute to the elucidation of the function of the chitinase genes in the biology of *M. anisopliae*, we analyzed the levels of transcripts of the *chit1*, *chi2* and *chi3* genes in different growth times and culture conditions. The secretion of chitinases and the consumption of sugars were also analysed in the cultures. Different carbon sources were used as: 1% glucose; 0.25% and 1% N-acetylglucosamine (NacGlc); 1% chitin; 1% *Boophilus microplus* cuticle; and 1% *Dysdercus peruvianus* cuticle. Culture times analysed were: 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 and 72 hours. The level of transcripts were analysed by using RT-PCR profiles of *chit1*, *chi2* and *chi3* genes of E₆ strain. The constitutively expressed *tef-1 α* gene from *M. anisopliae* was used as RNA loading control. The *chit1* gene transcripts, in all carbon sources analysed increased with the culture time. For *chi2* and *chi3* transcripts partial and complete processing forms were detected. The *chi2* transcription profile was very variable. The transcripts presented a gradual increase, in the different times and carbon sources, but not for glucose added cultures. For the *chi3* gene transcripts, with the exception of chitin added cultures, in all carbon sources presented both the partial and complete processed transcripts. The *chi3* transcription profile was also very variable, suggesting a complex regulation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) é um dos gêneros de fungos entomopatogênicos mais bem caracterizados e engloba diversos fungos entomopatogênicos assexuais (DRIVER *et al*, 2000). O fungo *M. anisopliae* foi descrito pela primeira vez por Metschnikoff na Rússia em 1987 parasitando larvas de besouro-de-grãos *Anisopliae austriaca*. Após a revisão de sua descrição em 1976, o gênero passou a compreender duas espécies, *Metarhizium anisopliae* (var. *minor* e *major*) e *Metarhizium flavoviride* (TULLOCH, 1976). No ano de 2000, DRIVER e colaboradores realizaram uma revisão taxonômica do gênero baseados em análise filogenética de seqüências de rDNA, reconhecendo então, três espécies para o gênero *Metarhizium* e 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.

Essa classificação também foi baseada nas diferenças morfológicas e coloração dos conídios do fungo. *M. album* possui conídios pequenos de forma ovóide a elípticos, medindo de 4 a 6 x 1,5 a 2,5 μm e de coloração marrom pálido; *M. flavoviride* var. *novazealandicum* possui conídios alongados medindo 6 ($\pm 0,48$) x 2,4 ($\pm 0,19$) μm ; *M. flavoviride* var. *flavoviride* possui conídios grandes com coloração verde pálido; *M. flavoviride* var. *pemphigum* possui conídios ovóides a alongados com 5,4 ($\pm 0,47$) x 2,4 ($\pm 0,43$) μm , apresentando coloração verde claro; *M. anisopliae* var. *acridum* possui conídios ovóides com 4,5 ($\pm 0,41$) x 2,6 ($\pm 0,6$) μm com coloração verde-amarelado escuro; *M. anisopliae* var. *lepidiotum* possui conídios com 7,3 a 10,6 x 3 a 4,1 μm e de coloração verde-amarelado escuro; *M. anisopliae* var. *anisopliae* possui conídios cilíndricos de 5 a 7 μm e de coloração verde; *M. anisopliae* var. *majus* possui conídios muito longos com mais de 10 μm de comprimento e de coloração verde escuro (DRIVER, 2000).

Durante muito tempo *M. anisopliae* foi classificado como Deuteromycota assexuado (TULLOCH, 1976), porém em 2001, LIU e colaboradores identificaram *M. anisopliae* var. *majus* como sendo a forma anamórfica do fungo *Cordyceps brittlebankisoides*, através da análise de seqüências ITS (*internal transcribed spacer* – espaçador interno transcrito de rDNA), sendo a partir daí, *M. anisopliae*, considerado um Ascomycota.

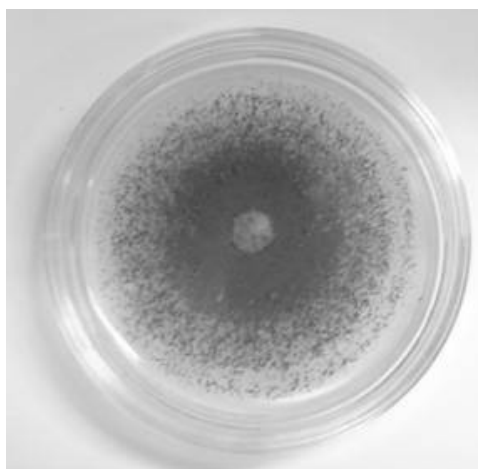


Figura 1. Características morfológicas da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. Cultivo de *M. anisopliae* em MCC a 28°C por aproximadamente 14 dias, mostrando uma colônia (figura cedida por Walquíria Arruda).

1.2 Mecanismos de infecção de fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos estão largamente distribuídos no reino Fungi. Alguns patógenos de insetos possuem restrição quanto aos seus hospedeiros, infectando somente algumas espécies de insetos, enquanto outros infectam uma variedade maior de hospedeiros, sendo o caso de *Metarhizium anisopliae* (CLARKSON & CHARNLEY, 1996).

A cutícula dos insetos possui duas camadas, a epicutícula e a procutícula. A epicutícula é uma camada de natureza protéica que recobre a procutícula, e é circundada por uma membrana fina cerosa composta de ácidos graxos, lipídeos e

esteróis. A procutícula compreende a maior parte da cutícula e sua composição é basicamente de natureza protéica e quitinosa (ANDERSEN, 1974).

Os conídios, produzidos assexuadamente, são geralmente responsáveis pela infecção e pela dispersão do fungo no ambiente, sendo assim disseminados aos seus hospedeiros susceptíveis. Quando os conídios entram em contato com a cutícula do hospedeiro, eles se fixam e germinam, iniciando uma série de reações de reconhecimento e ativação de enzimas entre o fungo e o hospedeiro (SHAH & PELL, 2003; SMALL & BIDOCHKA, 2005; ARRUDA *et al.*, 2005).

O conídio germina na superfície do hospedeiro formando o tubo germinativo. Estimulado pelo contato físico com a cutícula, o tubo germinativo se diferencia por dilatação da extremidade distal das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração. Esta é a primeira estrutura formada na preparação para a penetração através da cutícula do hospedeiro. Entretanto, apesar de ter grande importância na penetração, esta diferenciação não é parte obrigatória para o crescimento e a maturação do fungo, e sim uma resposta a um habitat em particular (ST. LEGER *et al.*, 1991a; CLARKSON & CHARNLEY, 1996; MENDGEN, 1996).

Alguns autores sugerem que o apressório está envolvido por uma substância mucilaginosa que se acredita ser composta principalmente de polissacarídeos e proteínas ou glicoproteínas, podendo estar envolvida no auxílio e transporte de enzimas que degradam a cutícula do fungo (ST. LEGER, *et al.*, 1989; DEAN, 1997; ARRUDA *et al.*, 2005). A diferenciação é estimulada por baixos níveis de compostos nitrogenados e pelo catabolismo de compostos de carbono (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Muitos autores sugerem o envolvimento de um mensageiro intracelular de Ca^{2+} e de AMP cíclico na formação do apressório em *Metarhizium* (ST. LEGER, *et al.*, 1991b; CLARKSON & CHARNLEY, 1996; DEAN, 1997). Na região do apressório que está em contato com a cutícula do hospedeiro, ocorre a formação de uma estrutura fina e saliente conhecida como grampo de penetração.

Durante a fase de penetração, há o envolvimento de enzimas e pressão mecânica na cutícula do hospedeiro. A composição complexa da cutícula dos artrópodes sugere que a penetração requer a ação sinérgica de diferentes

enzimas. As enzimas produzidas durante esta etapa são principalmente: N-acetilglucosaminidases (em baixa quantidade), proteases, quitinases e lipases (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; MENDGEN *et al.*, 1996).

A correlação entre a virulência de fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula de insetos tem sido investigada. Entretanto, até o presente, apenas uma protease está comprovadamente envolvida na patogenicidade de *M. anisopliae*, a protease PR1A. Esta e, provavelmente outras proteases, são fatores de virulência promovendo a degradação localizada de proteínas da cutícula, expondo os demais componentes da cutícula, promovendo a invasão do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1996b). A serino protease PR1A foi primeiramente descrita como sendo a principal proteína sintetizada durante o desenvolvimento do apressório em *M. anisopliae*, (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; ST. LEGER *et al.*, 1996a; WANG *et al.*, 2002), porém análises de bancos de ESTs demonstraram um grande número de genes sendo expressos em cultivos de *M. anisopliae* em meio mínimo acrescido de hemolinfa ou cutícula de insetos (FREIMOSER *et al.*, 2005). Neste estudo foi analisada a regulação diferencial de vários genes que codificam enzimas que degradam a cutícula do hospedeiro, proteínas de parede celular, toxinas e enzimas produtoras de toxinas, em diferentes cutículas, sugerindo que *M. anisopliae* possui a habilidade de regular a produção destas enzimas de acordo com os diferentes hospedeiros que infecta. *M. anisopliae* secreta uma grande variedade de proteases, das quais algumas estão associadas com sua virulência, já que elas facilitam a transposição da barreira da cutícula na penetração, a solubilização dos nutrientes e permite inibir peptídeos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro (FREIMOSER *et al.*, 2005).

Análises baseadas na similaridade de seqüências e na estrutura éxon/íntron, agruparam as subtilisinas descritas em *Metarhizium* em quatro grupos. Um grupo representado pela subtilisina PR1C de classe I (bacteriana), e três *clusters* de subtilisinas do tipo proteinase K de classe II: subfamília extracelular 1 (PR1A, PR1B, PR1G, PR1I e PR1K), subfamília extracelular 2 (PR1D, PR1E, PR1F e PR1J) e uma subtilisina endocelular (PR1H) (WANG *et al.*, 2002; BAGGA *et al.*, 2004; SMALL & BIDOCHKA, 2005).

SMALL & BIDOCHKA (2005) mostraram que o gene *pr1* (que codifica para uma protease do tipo subtilisina PR1 - sem identificação do tipo da protease mencionada) não é transcrito apenas nas fases iniciais do processo de infecção do fungo, mas também durante os estágios finais do processo de infecção quando o fungo emerge na superfície do cadáver e produz conídios. O gene *pr1* pode não estar diretamente envolvido na formação do conídio, mas se faz necessário para que se complete o ciclo de patogenicidade, para a morte do hospedeiro e produção de conídios. Durante estas duas últimas etapas comprovou-se maior expressão do gene *pr1* em experimentos de RT-PCR, tendo-se como controle de quantidade de RNA os transcritos do gene da β -actina. Além disso, foi demonstrado que recombinantes de *Metarhizium* contendo cópias múltiplas do gene *pr1A*, sob controle de um promotor constitutivo, têm a sua virulência aumentada, confirmando que proteases do tipo subtilisina podem ter um importante papel no desenvolvimento de biopesticidas (ST. LEGER *et al.*, 1996b). Porém, WANG e colaboradores (2002) mostraram que mutantes espontâneos estáveis de *M. anisopliae* linhagem V275 deficientes para os genes *pr1A* e *pr1B* ainda são capazes de infectar o hospedeiro *Galleria mellonella* em níveis similares aqueles da linhagem selvagem, mas com uma redução da patogenicidade para outro hospedeiro *Tenebrio molitor*.

As proteases são detectadas antes das enzimas quitinolíticas, em um período inferior a 24 horas após o início da formação do tubo germinativo. As quitinases provavelmente parecem em um período mais tardio como resultado da indução pela quitina existente na cutícula dos artrópodes, que só é exposta ao fungo após a digestão das proteínas a ela complexadas (ST. LEGER *et al.*, 1986).

Assim como as proteases, as quitinases, também estão envolvidas na patogenicidade de *M. anisopliae*. As quitinases e as proteases agem para solubilizar a cutícula dos hospedeiros durante a fase de penetração. Portanto, a secreção dessas enzimas é uma característica inicial importante no processo de infecção em resposta ao contato do fungo com a cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1998).

Em fungos filamentosos, as quitinases possuem pelo menos duas funções fisiológicas: estão envolvidas na síntese e degradação da parede celular e na

aquisição de nutrientes (SILVA *et al.*, 2005). As enzimas quitinolíticas serão descritas com mais detalhes no item 1.6.

Outras enzimas que podem estar envolvidas no processo de infecção de *M. anisopliae* são as lipases. Apesar de haver poucos estudos publicados a respeito de lipases em fungos entomopatogênicos, foi comprovada a sua secreção por *M. anisopliae* (BEYS SILVA *et al.*, 2005), pela purificação e caracterização de uma lipase de sobrenadante de cultivos do fungo induzidos por diferentes lipídeos como fonte de carbono. Além disso, foram identificadas seqüências parciais de lipases no banco de ESTs estabelecido por FREIMOSER e colaboradores (2005).

Após a penetração através da cutícula do hospedeiro, ocorre o desenvolvimento de blastóporos na hemocele. O meio nutritivo proporcionado pela hemolinfa leva à produção, por parte do fungo, de metabólitos secundários como ácidos orgânicos e toxinas, sendo que estas podem causar a morte do hospedeiro. (BIDOCHKA *et al.*, 1997; CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Após a morte do hospedeiro, a invasão de todos os tecidos e o esgotamento de nutrientes do hospedeiro, as hifas de *M. anisopliae* se estendem para fora do cadáver, formando micélio que cobre a superfície do tegumento, resultando na mumificação (MILNER, 2000). Em condições de temperatura ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos hidrofóbicos e de coloração verde oliva, que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos, resultando em novo ciclo de infecção (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; SHAH & PELL, 2003).

M. anisopliae produz uma família de toxinas ciclodepsipeptídicas (hexadepsipetídeos compostos de um ácido α -hidroxi e cinco resíduos de aminoácidos) denominadas destruxinas (DTX) de diferentes tipos A, B, C, D e E, e outras 27 variantes, dependendo da sua composição (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; BIDOCHKA *et al.*, 1997; HSIAO & KO, 2001; PEDRAS *et al.*, 2002). A grande maioria das destruxinas encontradas foi isolada de culturas de *M. anisopliae*, porém, algumas são oriundas de fitopatógenos. As destruxinas possuem atividade inseticida e fitotóxica. Há, ainda, destruxinas com uma grande variedade de atividades biológicas como, por exemplo: a atividade da destruxina

E de inibir a proliferação de células neoplásicas de mamíferos; e os efeitos supressores na superfície do antígeno viral da hepatite B da destruxina B, sugerindo ser um candidato em potencial no desenvolvimento de agentes contra a hepatite (PEDRAS *et al.*, 2002).

Segundo KERSHAW e colaboradores (1999), a injeção de destruxinas de *M. anisopliae* em larvas de lepidópteros e adultos de dípteros pode causar paralisia muscular. Linhagens muito virulentas produzem grande quantidade de destruxinas, mas linhagens que produzam pouca toxina são também virulentas, sugerindo que as destruxinas não são os únicos determinantes da patogenicidade.

Além das enzimas hidrolíticas e das toxinas, há alguns fatores que também podem estar envolvidos na patogenicidade de *M. anisopliae*. As superóxido-dismutases (SODs), enzimas que atuam como um sistema de defesa contra radicais livres de oxigênio (BITTENCOURT *et al.*, 2004) e a presença de micovírus com genoma de dsRNA (TIAGO *et al.*, 2004) são dois possíveis fatores envolvidos na patogenicidade.

Apesar de muitos avanços nos estudos em *Metarhizium*, os eventos moleculares envolvidos na infecção ainda não estão totalmente esclarecidos. O processo é multifatorial, existindo vários fatores que agem sinergisticamente para a patogenicidade. Alguns genes com envolvimento potencial no processo de infecção de *M. anisopliae* foram clonados e caracterizados: gene *pr1A* (ST. LEGER *et al.*, 1992a), gene *ssgA* (ST. LEGER *et al.*, 1992b), gene *pr2* (SMITHSON *et al.*, 1995), gene *pr1B* (JOSHI *et al.*, 1997), gene *crr1* (SCREEN *et al.*, 1997), gene *chit1* (BOGO *et al.*, 1998), gene *nrr1* (SCREEN *et al.*, 1998), gene *mecpa* (JOSHI & ST. LEGER, 1999), gene *chy1* (SCREEN & ST. LEGER, 2000), gene *chi2* (BARATTO *et al.*, no prelo) e gene *chi3* (SILVA *et al.*, 2005).

Também em nosso grupo, DUTRA e colaboradores (2004) identificaram seqüências com expressão diferencial em *M. anisopliae* (linhagem E6) em condições de infecção usando uma metodologia de análise de bibliotecas de subtração (RDA, *representational difference analysis*). Foi realizada a comparação de duas populações de cDNA: uma população gerada em cultivos sob repressão catabólica - em presença de glicose, a outra população foi gerada

a partir de cultivo em “condições de infecção” - em presença de cutícula do carrapato *Boophilus microplus*. Entre as seqüências gênicas identificadas neste trabalho que provavelmente possuem importância na virulência estão: uma protease do tipo subtilisina (gene *pr1C*), o gene que codifica para uma proteína de membrana provavelmente envolvida na diferenciação de apressório (*pth11*), genes envolvidos no metabolismo energético e de lipídeos (transdolase e *gapdh*), uma proteína de choque térmico/chaperona (HSP70) e uma proteína homóloga a uma exo- β -1,3 glicanase.

ARRUDA e colaboradores (2005), usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), descreveram os eventos e respectivos tempos de duração do processo de infecção de *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus* como esquematizado na Figura 2. Resumidamente: (i) aderência do conídio á cutícula através de uma fina camada mucilaginosa, 24h pós-infecção; (ii) germinação do conídio e desenvolvimento do tubo germinativo que coloniza a superfície da cutícula entre 24 e 48h pós-infecção; (iii) penetração do fungo através da cutícula do carrapato entre 24 e 48h pós-infecção e (iv) colonização da cutícula e emergência do fungo até a superfície entre 72 e 96h pós-infecção.



Metarhizium anisopliae



Figura 2. Etapas do processo de infecção de *Metarhizium anisopliae* em *Boophilus microplus* (ARRUDA *et al.*, 2005).

1.3 O fungo *Metarhizium anisopliae* e o controle biológico

Apesar dos defensivos agrícolas terem uma alta e rápida eficiência são necessárias aplicações repetidas desses produtos, o que representa grandes quantidades lançadas no ambiente e um alto custo. Esses produtos químicos propiciam alta produtividade, mas têm efeitos deletérios sobre o solo, clima, vegetação, águas, animais e homem, e provocam a seleção de mutantes resistentes, resultantes da forte pressão seletiva. Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar. Nesse contexto, o controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas e patógenos, e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência (FRANCESCHINI *et al.*, 2001).

O termo controle biológico se aplica à utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para diminuir, a um limiar sub-clínico e economicamente aceitável, a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola (GRONVOLD *et al.*, 1996).

Sendo a classe animal mais abundante e diversificada, os insetos são infectados por uma grande variedade de patógenos, incluindo vírus e bactérias. Porém, a maioria das doenças ocorridas em insetos é causada por fungos, sendo que o impacto causado na população demonstra seu potencial para controle microbiológico de insetos de interesse médico e agrônômico. Os fungos, ao contrário das bactérias e vírus, não precisam ser ingeridos para causar doenças, eles penetram diretamente na cutícula do hospedeiro (WANG & ST. LEGER, 2006).

EKESI e colaboradores (2005) testaram três formulações de *M. anisopliae* em óleo, em água e de forma granulada crescida em milho contra três espécies de moscas da fruta, obtendo resultados positivos e alta eficiência no controle destas pragas por *M. anisopliae*, principalmente as formulações feitas de forma granular e em óleo.

Uma formulação granular de *M. anisopliae* foi desenvolvida pela BioGreen e registrada na Austrália, usada para o controle de *Adoryphorus couloni* Burmeister, onde uma única aplicação no solo do produto, pode impedir a existência deste patógeno no período de cinco a dez anos (JACKSON, 1999).

Devido a grande importância do estudo a respeito das doenças tropicais, como a malária, que tem infectado anualmente 300 a 500 milhões de pessoas, tem-se utilizado o controle biológico contra estas doenças, já que os insetos vetores muitas vezes se tornam resistentes aos inseticidas utilizados, e que estes inseticidas também podem se tornar tóxicos aos seres humanos e poluir o ambiente (SCHOLTE *et al.*, 2003). Foram realizados experimentos com resultados bastante satisfatórios utilizando-se *M. anisopliae* (formulações em óleo e de conídios secos) no controle do mosquito vetor da malária, *Anopheles gambiae* e do mosquito vetor da filariose, *Culex quinquefasciatus* (SCHOLTE *et al.*, 2003). O uso de *M. anisopliae* contra mosquito da malária tem sido eficiente quando realizado tanto no campo como em laboratório (SCHOLTE *et al.*, 2004, 2006). Além da aplicação direta do fungo no ambiente em que se encontram os mosquitos vetores, demonstrou-se que fêmeas infectadas com *M. anisopliae* infectam os machos durante a cópula através das patas e aparelho bucal (SCHOLTE *et al.*, 2004).

Vários agentes de controle biológico têm sido utilizados para combate de gafanhotos e grilos. Dentre os motivos pelo qual têm se evitado usar agentes químicos contra estes insetos, estão: o grande dano à saúde dos operadores dos fármacos utilizados, prejuízo aos pássaros, outros vertebrados, organismos aquáticos, contaminação da água, entre outros (LOMER *et al.*, 2001).

Segundo o manual de pesticidas biológicos (Bio Pesticides Manual) editado por Copping em 2001, existem 96 ingredientes ativos comercializados com base em microrganismos. Trinta e três são baseados em bactérias, 36 em fungos e 8 em nematóides entomopatogênicos. Mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos foram descritos. A habilidade dos fungos entomopatogênicos de penetrar na cutícula de artrópodes, a habilidade de uma linhagem de matar os diversos estágios larvais de um mesma praga e a especificidade de uma linhagem em relação a virulência contra uma ou um pequeno grupo de pragas, faz destes

fungos ótimos candidatos a agentes de controle biológico. Porém, os fungos também apresentam algumas desvantagens: eles matam seus hospedeiros de forma muito lenta, necessitam de umidade para germinar e esporular, são sucessíveis a radiação UV, e algumas linhagens podem atacar outros artrópodes além daqueles que realmente eram seus alvos (SAMISH, 2004).

KAAYA e MUNYINYI (1995) demonstraram que *M. anisopliae* e *B. bassiana* são capazes de infectar a mosca *Glossina morsitans morsitans* no solo durante seus diferentes estágios larvais. Em estudos anteriores estes autores não observaram nenhuma mortalidade nos estágios de vida iniciais de *G. m. morsitans* quando expostas a uma solução aquosa de esporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Quando expostas a esporos secos destes fungos relataram mortalidade somente de adultos recém emergidos de pupas infectadas com *B. bassiana* e não com *M. anisopliae*. Porém, com aplicações de esporos secos misturados à areia, observou-se eficiência na infecção destes fungos contra esta espécie de mosca, principalmente em tratamentos com larvas recém ovopositadas e em adultos, que podem infectar outros adultos selvagens durante a cópula.

Vários estudos com *M. anisopliae* têm sido realizados no seu emprego como biocontrolador de muitas espécies de pragas como: larvas de *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) (BRUCK *et al.*, 2005); *Atta cephalotes* (LOPEZ & ORDUZ, 2003); *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) (MANIANIA *et al.*, 2001); *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) (WEKESA *et al.*, 2005); assim como, na interação de *M. anisopliae* com nematóides para controle de *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) (ANSARI *et al.*, 2004).

Nosso modelo de estudo, o carrapato *B. microplus* é um ectoparasita que infesta preferencialmente o gado, causando grandes perdas econômicas, chegando, no Brasil, a ser de milhões de dólares (PAIÃO *et al.*, 2001). Para o seu controle, ultimamente, tem-se utilizado, na maioria das vezes, acaricidas químicos. Porém, o controle biológico e o controle imunológico estão sendo cada vez mais usados para o controle dessas pragas. Os principais motivos para o uso do controle biológico de carrapatos são: ser menos danoso ao homem e ao meio ambiente, pelos altos custos do controle químico, e pelo aumento da

resistência dos carrapatos aos pesticidas (FRAZZON *et al.*, 2000; SAMISH *et al.*, 2004). O resultado de diversos testes para as duas vacinas existentes contra *B. microplus* têm demonstrado somente sucesso parcial no controle de carrapatos (FRAZZON *et al.*, 2000).

O uso de *M. anisopliae* contra *B. microplus* foi demonstrado eficaz em diversos estudos. FRAZZON e colaboradores (2000) aplicaram esporos de *M. anisopliae*, *in vitro*, em fêmeas engurgitadas de *B. microplus* e os resultados demonstraram alta infectividade do fungo. Foi comprovada também a eficácia infectiva de *M. anisopliae* quando aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *B. microplus* (BITTENCOURT *et al.*, 2003).

Estudos foram realizados aplicando-se *M. anisopliae* em gado estabulado infestados com *B. microplus*. Apesar de haver desenvolvimento e esporulação do fungo, os índices de mortalidade obtidos em testes laboratoriais não se repetem, provavelmente, pelas alterações de umidade e temperatura que não se mantêm constantes no campo (CORREIA *et al.*, 1998).

O emprego de inseticidas microbianos já está regulamentado em muitos países, inclusive no Brasil. As medidas prescritas por entidades normativas incluem o registro de produtos e a avaliação de segurança em relação aos usuários, impactos no ambiente e implicações na saúde pública. Já existem formulações especiais de fungos registradas no Brasil sob o nome de Metabiol e de Biomax (ROBBS & BITTENCOURT, 1998).

1.4 O carrapato *Boophilus microplus*

Nosso grupo tem utilizado dois modelos de hospedeiros para estudar a infecção de *M. anisopliae*. Estes modelos são: o carrapato *B. microplus* e o percevejo *D. peruvianus*. Estes trabalhos têm sido realizados com o apoio do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) para os experimentos com carrapatos; e com o apoio do Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia, UFRGS, para os experimentos com percevejos (coordenado pela Profa. Dra. Célia Carlini).

Muitos autores têm demonstrado resultados positivos em estudos da infecção de fungos no carrapato *B. microplus*. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que *M. anisopliae* tem ação patogênica sobre *B. microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000; BITTENCOURT *et al.*, 2003; SAMISH *et al.*, 2004; ARRUDA *et al.*, 2005; POLAR *et al.*, 2005). Porém o mecanismo de infecção em carrapatos, apesar de parecer similar ao descrito para insetos, não é muito conhecido. ARRUDA e colaboradores (2005) analisaram o processo de infecção de *M. anisopliae* em *B. microplus* por microscopia óptica, a fim de verificar o modo de penetração e as mudanças ocorridas durante a infecção de *M. anisopliae*. Neste trabalho foram visualizadas três camadas no tegumento de *B. microplus*: endocutícula, exocutícula e a epicutícula. A epicutícula é uma camada fina que recobre as duas demais, que juntas formam a procutícula (ARRUDA *et al.*, 2005).

O carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini) (Figura 3) é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino. Encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania entre os paralelos 32° N e 32° S, sendo um dos principais parasitas que afetam a pecuária destas áreas. *B. microplus* acarreta diversos danos econômicos, tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul, pois um carrapato bovino suga, em média, de 2 a 3mL de sangue do seu hospedeiro, o que se reflete em grandes perdas na produção de leite e carne e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato. Ainda, o carrapato pode atuar como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela rickétsia do gênero *Anaplasma* (ANGUS, 1996; LEAL *et al.*, 2003; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006). *B. microplus* também afeta gado europeu e gado híbrido brasileiro, podendo causar anemia. Este parasita pode modificar significativamente os parâmetros bioquímicos sanguíneos, assim como afetar as funções renais e digestivas de seu hospedeiro (CORREIA *et al.*, 1998; GONZÁLEZ-ACUÑA & GUGLIELMONE, 2005).

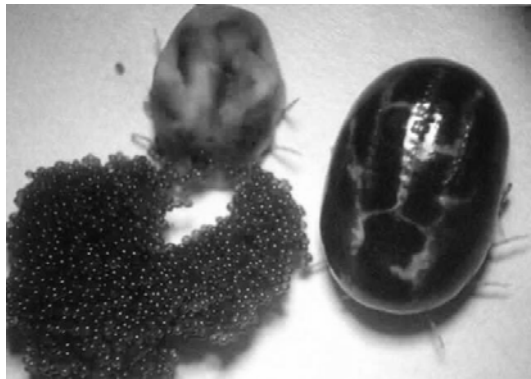


Figura 3. Teleógina de *B. microplus* em processo de oviposição. Fêmea de *B. microplus* ovopositando (esquerda), com diminuição considerável de tamanho comparado com fêmea ingurgitada (direita - tamanho aproximado de 5 mm) (<http://www.ufrgs.br/depbiot/201/carrapat.htm>).

No Brasil, mais especificamente no Rio Grande do Sul, o problema da diminuição da produção de carne bovina aumentou devido à introdução de espécies de gado *Bos taurus* suscetíveis aos carrapatos. Mais recentemente foram introduzidas espécies de *Bos indicus* que são mais resistentes a *B. microplus*, porém, este fato não aumentou significativamente o controle de carrapatos (EVANS *et al.*, 2000).

1.5 O percevejo manchador de fibra de algodão *Dysdercus peruvianus*

Representantes do gênero *Dysdercus* Guérin Menéville, 1831 (Hemiptera: Pyrrhocoridae) foram registrados atacando algodoeiro (*Gossypium* spp.) em diversos países da América, África, Ásia e na Austrália. Este gênero é de grande interesse econômico, pois a ele pertencem algumas das mais sérias pragas do algodoeiro nos países em que se cultiva esta *Malvaceae*. De sua dieta principal também fazem parte plantas das famílias *Amaranthaceae*, *Bombacaceae*, *Compositae*, *Rubiaceae* e *Sterculiaceae* (GONÇALVEZ, 2000).

Dysdercus peruvianus Guérin-Menéville (Hemíptera: Pyrrhocoridae) (Figura 4) é um inseto praga da cultura de algodão, conhecido vulgarmente como

percevejo manchador de fibra do algodão. Este inseto causa danos como, queda ou mau desenvolvimento das sementes, manchas nas fibras, e introdução de fungos e bactérias, levando á perdas totais da cultura do algodão (STANISÇUASKI *et al.*, 2005).

Testes de bioensaio com ninfas de quarto instar e adultos de *D. peruvianus* infectados por *M. anisopliae* linhagem E₆ foram realizados e demonstraram que *M. anisopliae* é capaz de infectar e matar, após 10 dias, tanto ninfas como adultos de *D. peruvianus* (Lucélia Santi, comunicação pessoal). Assim como para *B. microplus* (ARRUDA *et al.*, 2005) foram realizados experimentos de microscopia eletrônica de varredura em *D. peruvianus*, onde foi comprovada a penetração de *M. anisopliae* (Lucélia Santi, comunicação pessoal).

Como dito anteriormente, tanto carrapatos como insetos possuem as mesmas camadas e a mesma constituição de seu tegumento, porém acredita-se que por pertencerem a classes diferentes, estes dois artrópodes podem apresentar diferenças em relação ao modo de ação de quitinases durante a penetração de *M. anisopliae* em sua cutícula. Para tanto, este inseto foi escolhido como modelo de estudo de nosso grupo, e depois de comprovada a infecção e morte destes por *M. anisopliae*, decidiu-se utiliza-los nos cultivos de *M. anisopliae*, a fim de verificar as diferenças na transcrição dos genes de quitinases durante a infecção de sua cutícula.

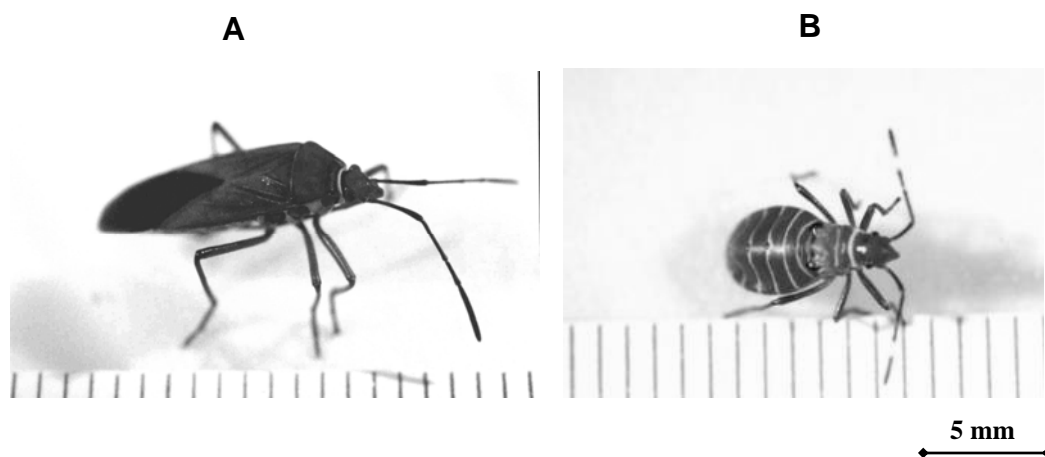


Figura 4. Estágios de adulto e ninfa de *Dysdercus peruvianus*. (A) Inseto adulto. (B) Ninfa de 3° instar (figura cedida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Proteínas Tóxicas, UFRGS).

1.6 Quitina e quitinases

A quitina (Figura 5), um polímero de ligações β -1,4 de N-acetilglicosamina (NacGlc), é amplamente distribuído, sendo, depois da celulose, o polissacarídeo mais abundante na natureza. É o maior constituinte da parede celular de fungos, exoesqueleto de insetos e conchas de crustáceos (ADAMS, 2004; DAHIYA *et al.*, 2005; HUANG & CHENG, 2005; BONFIM *et al.*, 2006).

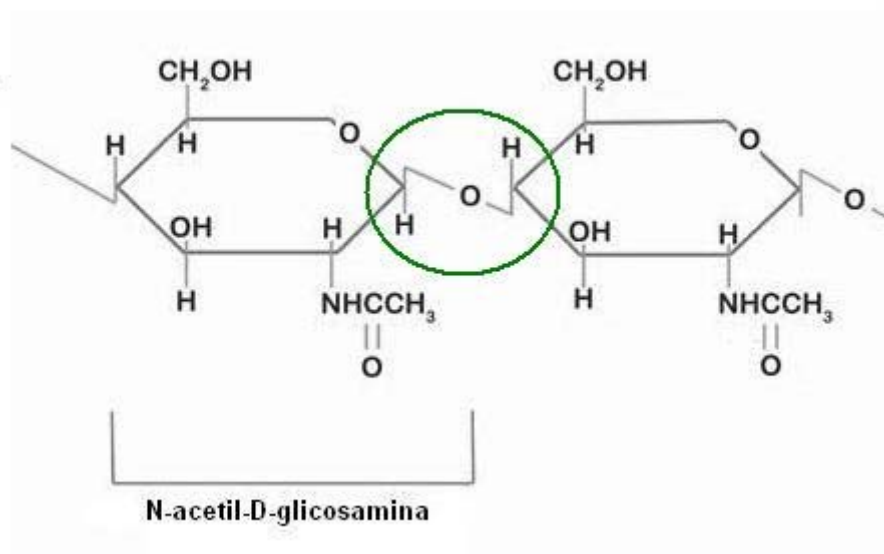


Figura 5. Estrutura química da quitina. O círculo mostra as ligações tipo β -1,4 entre as cadeias de N-acetilglicosamina.

A quitina é um elemento importante para o desenvolvimento fúngico. Portanto, é provável a existência de um sistema que possibilite o remodelamento por meio da degradação e posterior síntese de quitina, permitindo, assim, a plasticidade da parede celular, fato que pode ser importante para o brotamento e alongamento da hifa (DAHIYA *et al*, 2005).

Através de análises de difração de raios X, foi revelado que a quitina pode ocorrer em três formas polimórficas: α -quitina, β -quitina e γ -quitina. Na α -quitina, a forma mais abundante de quitina, as cadeias são arranjadas de forma anti-paralela, enquanto na β -quitina as cadeias estão na forma paralela. Na γ -quitina ocorre as duas formas de cadeias (DAHIYA *et al*, 2005)

As quitinases, quitina-sintases e N-acetil-D-glicosaminidases são enzimas hidrolíticas envolvidas no metabolismo de parede celular de células de fungos em crescimento (BONFIM *et al.*, 2006). A hidrólise enzimática completa da quitina em cadeias livres de NacGlc é feita por um sistema quitinolítico, cuja ação é sinérgica e consecutiva (PATIL *et al*, 2000).

As quitinases estão incluídas em uma classe de enzimas do grupo das glicosil-hidrolases com a propriedade de hidrolisar as ligações β -1,4 existentes

entre os monômeros de NacGlc (FLACH *et al.*, 1992). Elas ocorrem em inúmeros organismos tais como, vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas superiores e mamíferos. Em fungos a função das quitinases está relacionada com a autólise, a nutrição, a morfogênese e a defesa (PATIL *et al.*, 2000; DAHIYA *et al.*, 2005).

Foram usadas seqüências similares de peptídeos para agrupar as quitinases em cinco classes. As classes I, II e IV compreendem as quitinases originadas de plantas que não são estruturalmente relacionados às quitinases das classes III e V. As quitinases da classe III são derivadas principalmente de plantas e fungos, enquanto que as da classe V, de bactérias (GRUTHRIE *et al.*, 2005).

Em relação aos produtos de hidrólise da quitina, as quitinases podem ser classificadas em duas categorias principais. As endoquitinases clivam a quitina aleatoriamente gerando polímeros ou oligômeros de NacGlc, como a quitotetraose, a quitotriose e a diacetilquitobiose. As exoquitinases podem ser divididas em quitobiosidases, que atuam liberando unidades de di-acetilquitobiose 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 NacGlc (Figura 6) (PINTO *et al.*, 1997; BARATTO *et al.*, 2003; DAHIYA *et al.*, 2005; GRUTHRIE *et al.*, 2005).

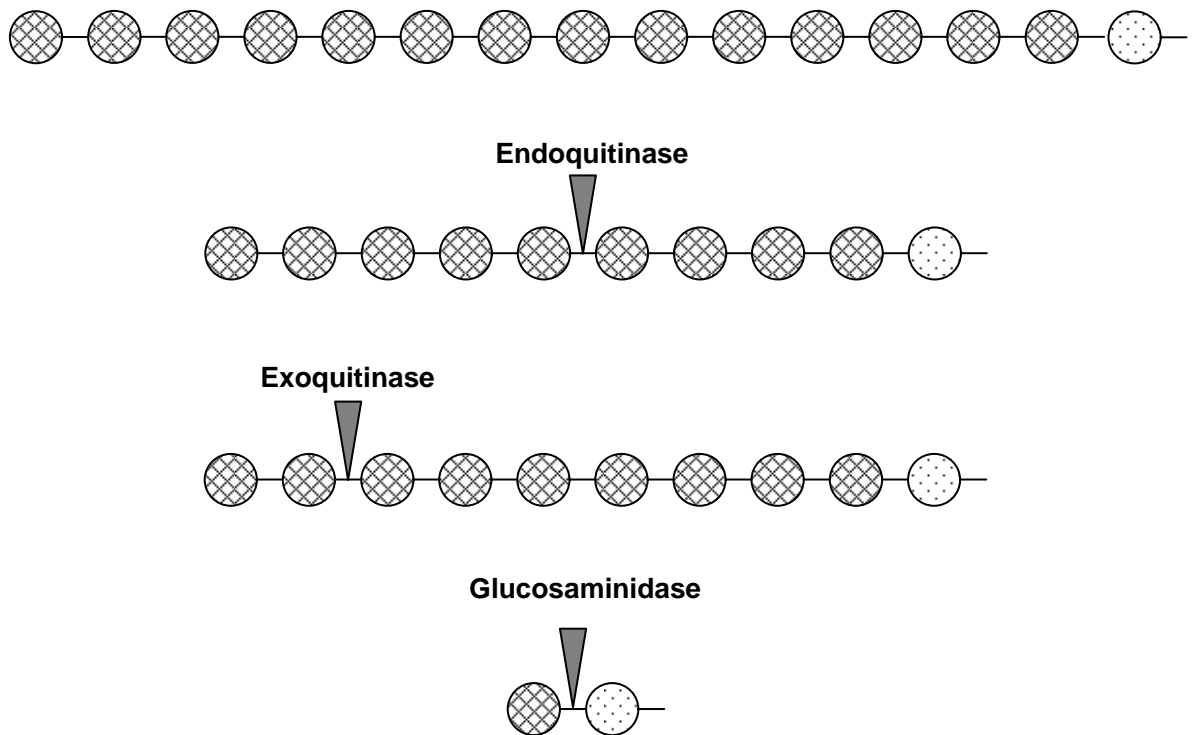


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ação das quitinases. Em quadriculado estão representadas as fibras da quitina e pontilhado os monômeros de NacGlc compreendendo sua porção terminal. Estão representadas as enzimas: endoquitinase, exoquitinase e glicosaminidase (modificado de SAHAI & MANOCHA, 1998).

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 diversificada evolutivamente, contendo quitinases de bactérias, fungos, vírus, animais e algumas plantas. A família 19 consiste em quitinases de plantas (classe I, II e IV) e algumas quitinases de *Streptomyces*. Estas duas famílias não apresentam nenhuma similaridade em relação às seqüências de aminoácidos. Elas possuem estruturas 3D e mecanismos moleculares completamente diferentes. A família 18 possui um domínio catalítico $(\alpha/\beta)_8$ em forma de barril, enquanto que as quitinases da família 19 possuem uma estrutura bilobular composta predominantemente de α -hélices. As famílias também diferem quanto ao mecanismo de reação, a família 18 possui mecanismo de retenção

(configuração de β -anômeros), enquanto que a família 19 possui mecanismo de inversão (os produtos são α -anômeros). A família 20 inclui as β -N-acetilexosaminidases de bactérias e humanos (DAHIYA *et al.*, 2005; SEIDL *et al.*, 2005).

As microfibrilas de quitina constituem 30% da cutícula de insetos, que são o sítio primário de entrada e infecção por fungos entomopatogênicos, por isso representa uma barreira para a invasão. Por esse motivo, as enzimas quitinolíticas juntamente com as proteases, são provavelmente as enzimas mais críticas na invasão de seus hospedeiros (ST. LEGER *et al.*, 1996a). O fungo sintetiza quitinases extracelulares que degradam os polímeros tornando seus produtos acessíveis ao metabolismo do fungo, portanto a atividade quitinolítica tem sido considerada importante para a patogenicidade, o que tem sido demonstrado em estudos com diversos fungos entomopatogênicos (BOGO *et al.*, 1998; KANG *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2005).

Em *M. anisopliae*, as proteases são produzidas primeiramente para degradar a cutícula, o que permite que as quitinases penetrem nesta cutícula, já que os níveis de quitinases aumentam nas zonas de degradação produzidas pelas proteases, levando a concluir que estas duas enzimas agem sinergisticamente na solubilização da cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1996a; BOGO *et al.*, 1998; SCREEN *et al.*, 2001; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que fungos entomopatogênicos produzem uma mistura de enzimas quitinolíticas durante seu desenvolvimento em cutícula de artrópodes. A produção limitada de quitinases em pH ótimo (pH 5,0) pode ser um fator importante em termos de coordenação da síntese de proteases (PR1) e síntese de quitinases, sob condições alcalinas de infecção (ST. LEGER *et al.*, 1998).

1.6.1 Quitinases descritas em *Metarhizium anisopliae*

ST. LEGER e colaboradores (1996a) identificaram duas proteínas de massa molecular de 43,5 e 45 kDa (pI 4,8) em sobrenadantes de cultura de *M. anisopliae*, em meio contendo cutícula de inseto durante 4 dias de cultivo. As seqüências N-terminais confirmam que cada banda consiste em uma única proteína. As seqüências N-terminais das duas bandas são idênticas (Ala-Gly-Gly-Tyr-Val-Asn-Ala-Val-Tyr-Phe-Tyr-Thr-Asn-Trp-Gly-Leu-Tyr-Leu-Ser-Asn-Tyr-Gln-Pro-Ala) e apresentam 66% de identidade com a região correspondente da endoquitinase de 42 kDa de *Trichoderma harzianum* (ECH42) (Ala-Asn-Gly-Tyr-Ala-Asn-Ser-Val-Tyr-Phe-Thr-Asn-Trp-Gly-Iso-Tyr-Asp-Arg-Asn-Phe-Gln-Pro-Ala-Asp), a qual é ortóloga á quitinase CHI18-5 de outras espécies *Trichoderma* (SEIDL *et al.*, 2005).

Uma quitinase de aproximadamente 30 kDa (CHIT30) foi purificada por PINTO e colaboradores (1997). Esta quitinase apresentou atividade de degradação de quitina coloidal, tetrâmeros, trímeros e dímeros de NacGlc, sendo a primeira enzima descrita que apresenta atividade de endo e exoquitinase no mesmo polipeptídeo. Devido à capacidade de degradar completamente a quitina, a CHIT30 é uma forte candidata a participação na degradação da cutícula do hospedeiro durante o processo de penetração. Um anti-soro específico para a quitinase CHIT30 foi produzido e detectou alta produção desta proteína durante a penetração de *M. anisopliae* em *B. microplus* (SILVA *et al.*, 2005).

BOGO e colaboradores (1998) clonaram o gene *chit1* de *M. anisopliae* que codifica para uma proteína predita madura de 42 kDa (CHIT42). A massa molecular e a seqüência de aminoácidos N-terminal são semelhantes (apenas três alterações em vinte resíduos) com uma das quitinases descrita por ST. LEGER (1996a), sendo provavelmente ortóloga das quitinases de 43,5 e 45 kDa (BARATTO *et al.*, 2003). O gene *chit1* foi expresso em *Escherichia coli* por BARATTO e colaboradores (2003). A proteína recombinante produzida foi caracterizada através de ensaios com glicol-quitina e com substratos sintéticos de dímeros e tetrâmeros de NacGlc como uma endoquitinase (BARATTO *et al.*, 2003).

Uma outra quitinase de *M. anisopliae* linhagem ATCC 20500 de 60 kDa foi purificada por KANG e colaboradores (1999), mostrando-se diferente das descritas anteriormente, já que as suas massas moleculares correspondem a 33, 43,5 e 45 kDa para endoquitinases, 10 kDa para a exoquitinase (N-acetilglicosaminidase) e 30 kDa para a enzima com atividade de endo e exoquitinase, como mencionado anteriormente. As seqüências N-terminais desta quitinase de 60 kDa também são diferentes daquelas descritas anteriormente. Este mesmo grupo detectou uma quitinase semelhante à de 60 kDa em um clone de cDNA de *M. anisopliae*; este clone contém uma seqüência de 522 aminoácidos e uma massa molecular calculada de 58 kDa (KANG *et al.*, 1998). A partir de ensaios enzimáticos, CHIT60 demonstrou atividade de endo e exoquitinase (KANG *et al.*, 1999).

SILVA e colaboradores (2005) observaram que, cultivos de *M. anisopliae* em presença de quitina, secretaram pelo menos cinco isoenzimas como visualizado em gel de atividade de quitinase (por incorporação no gel de glicol-quitina). Isto difere do que foi sugerido por ST. LEGER e colaboradores (1993), que sugeriu pelo menos 10 isoenzimas em gel de atividade contendo glicol-quitina. Estas múltiplas bandas podem ser decorrentes da variação de migração do gel, além disso, as linhagens de *Metarhizium* utilizadas nos dois estudos são diferentes.

1.6.2 Genes de quitinases isolados de *Metarhizium*

Até o momento, pelo menos seis diferentes quitinases (correspondentes a proteínas de 30; 33; 43,5; 45; 60 e 110 kDa) foram caracterizadas em *Metarhizium*, porém somente três genes foram isolados (*chit1*, *chi2* e *chi3*). O gene *chit1* que foi totalmente caracterizado (BOGO *et al.*, 1998), apresentou uma ORF de 1.521 pb que codifica para 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) (SILVA *et al.*, 2005). 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 (BARATTO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005).

Outros estudos foram realizados com o gene *chit1*. SCREEN e colaboradores (2001) demonstraram que transformantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* superexpressando o gene *chit1* de *M. anisopliae* var. *acidum* não alterou a patogenicidade contra *Manduca sexta*, sugerindo que provavelmente, os níveis de quitinase da linhagem selvagem e seu modo de regulação não são limitados apenas pela penetração da cutícula. Observa-se que este estudo difere de muitos outros, inclusive em outros fungos, como em *Trichoderma*, no qual o aumento da secreção de quitinases leva ao aumento da capacidade micoparasitária do fungo (LIMON *et al.*, 1999; SCREEN *et al.*, 2001).

A partir do seqüenciamento de ESTs da linhagem ME1 de *M. anisopliae* var. *acidum* provindos de RNA extraído do fungo cultivado em quitina e/ou cutícula de inseto como fonte de carbono, foi obtida a seqüência parcial do gene *chi2* (1.437 pb, não apresentando a porção N-terminal nem a região 5' traduzida) (FREIMOSER *et al.*, 2003, Genbank AJ293217). Este gene foi isolado de um banco de cDNA de *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆, este construído a partir de RNA extraído do fungo cultivado em presença de cutícula de carrapato. O gene foi totalmente seqüenciado e apresenta 1.713 pb interrompidos por dois introns de 210 e 75 pb, respectivamente (BARATTO *et al.*, no prelo).

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. Este fato sugere que seja um possível "processamento alterado", já que possui seqüências semelhantes às encontradas em processamento alterado descrito no fungo *Phanerochaete chrysosporium* (LARRONDO *et al.*, 2004).

A análise do genoma de *Phanerochaete chrysosporium* revelou três genes *mco*. Múltiplos alinhamentos confirmam que estes genes codificam para um novo

tipo de oxidase “multicobre” (*multicopper oxidase*). Inesperadamente, os cDNAs correspondentes ao gene *mco* mostram a presença de variantes múltiplas de processamento. Os transcritos alterados contêm diversos íntrons e, em alguns casos, ocorre falta de éxons. A presença de códon de parada dentro dos íntrons pode impedir a síntese de uma enzima ativa. Este fenômeno foi denominado de “processamento alterado” (*altered splicing*), para diferenciar do conhecido “processamento alternativo” (*alternative splicing*), que geralmente leva à tradução em proteínas funcionais (LARRONDO *et al.*, 2004).

O gene *chi3*, previamente descrito em *M. anisopliae* var. *acidum* por SCREEN & ST. LEGER (número de acesso AJ293218) e por FREIMOSER e colaboradores (2003), foi isolado por SILVA e colaboradores (2005) em *M. anisopliae* (linhagem E₆). Através do antisoro específico para a quitinase CHIT30 que detecta alta produção desta proteína durante 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. *acidum* (SILVA *et al.*, 2005). O gene *chi3* codifica para 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).

1.6.3 Mecanismos de regulação de quitinases

Segundo SAHAI & MANOCHA (1998), o mecanismo proposto para a regulação da expressão gênica de quitinases segue o modelo repressor-indutor, onde a quitina ou produtos de sua degradação são indutores e a glicose age como repressor, efeito conhecido como repressão catabólica. A secreção constitutiva de quitinase também foi demonstrada, sugerindo que níveis basais de

quitinase podem dar início ao processo de hidrólise de quitina (SAHAI & MANOCHA, 1998).

A regulação de genes que codificam para enzimas que hidrolisam a quitina é complexa, envolvendo a combinação de indução/repressão de carbono/nitrogênio (ST. LEGER *et al.*, 1998; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003). As quitinases envolvidas no processo de infecção são requeridas somente por períodos curtos durante a penetração através da cutícula dos hospedeiros e são fortemente reguladas por produtos da degradação da quitina.

O sistema quitinolítico de *M. anisopliae* é regulado por um mecanismo de indução-repressão, onde a quitina induz tanto à síntese quanto à secreção de quitinases, enquanto a glicose é um repressor da síntese. A concentração do monômero de NacGlc também regula a síntese e secreção das quitinases, onde baixas concentrações de NacGlc (até 0,5%) induzem, enquanto altas concentrações reprimem (1%) (BARRETO *et al.*, 2004; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003).

Nosso grupo tem realizado a análise da regulação de quitinases em *M. anisopliae*. Inicialmente foi estudada a regulação da secreção destas enzimas em cultivos contendo diversas fontes de carbono (BARRETO *et al.*, 2004; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARATTO, 2005). Análises de *Western blot* de proteína total de *M. anisopliae* extraídas de culturas induzidas e reprimidas mostraram altos níveis da quitinase CHIT30 somente quando em presença de quitina, cutícula de carrapato ou baixas concentrações de NacGlc. Por outro lado, cultivos em altas concentrações de glicose e NacGlc, não apresentaram níveis detectáveis da quitinase CHIT30 (SILVA *et al.*, 2005).

Para verificar o nível de transcrição dos genes *chit1* e *chi2* de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono, BARATTO (2005), utilizou a técnica de RT-PCR. Foi verificado que, diferentemente do esperado (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003), o gene *chit1*, foi expresso mesmo na presença de glicose, assim como o gene *chi2*, que apresentou indução na presença de glicose e NacGlc, mesmo em baixas concentrações.

Outra condição que pode interferir nos níveis de produção de enzimas, além da indução/repressão de carbono/nitrogênio, é a variação do pH. A

modificação do pH do meio é uma propriedade dos fungos filamentosos, sugerindo que este fator regula a expressão de genes de virulência de *M. anisopliae*. As proteases são secretadas em pH básico e as quitinases em pH ácido (ST. LEGER *et al*, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a expressão de genes que codificam quitinases do entomopatógeno *M. anisopliae* para entender a função de cada um destes genes na biologia do fungo.

2.2 Específicos

- Analisar o padrão de transcrição dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em diferentes tempos e condições de cultivo do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* utilizando a metodologia de RT-PCR.

- Acompanhar a secreção de quitinases e o consumo de açúcares nos sobrenadantes das condições de cultivo utilizadas.

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). A principal característica desta linhagem é a sua alta eficiência para controlar o carrapato bovino *Boophilus microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000).

3.1.2 Suspensão de esporos de *M. anisopliae*

Esporos de *M. anisopliae* foram coletados a partir de culturas em placas de Petry em meio MCc sólido (item 3.2.2) incubadas a 28°C por sete dias. Com o auxílio de alça de Drigalski e de 5 a 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. Suspensões contendo cerca de 10^8 esporos \cdot mL⁻¹ foram estocadas a 4°C até o uso por, no máximo, duas semanas.

3.2 Meios de Cultivo e manutenção de *M. anisopliae*

Todos os meios de cultivo foram preparados com água bidestilada e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min. Para meios de cultivo sólidos, foi adicionado agar para uma concentração final de 1,5%. Os meios foram

preparados seguindo as recomendações de SAMBROOK & RUSSEL (2001), GIMÉNEZ-PECCI *et al.* (2002), BOGO *et al.* (1998) e DUTRA *et al.* (2004).

3.2.1 Meio LB (Luria-Bertani)

- Triptona 1% (p/v)
- Extrato de Levedura 5% (p/v)
- NaCl 1% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0 com HCl 1 M.

3.2.2 Meio de Cove Completo (MCc)

- Glicose 1% (p/v)
- Nitrato de Sódio 0,6% (p/v)
- Caseína Hidrolisada 0,15% (p/v)
- Extrato de Levedura 0,05% (p/v)
- Peptona 0,2% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH 10 M. Após a esterilização em autoclave, foram adicionados assepticamente Solução de Sais 2% (v/v) e Solução de Elementos Traços 0,04% (v/v).

3.2.3 Meio Mínimo

- Glicose 1% (p/v)
- Nitrato de sódio 0,6% (p/v)

Após a esterilização em autoclave, foram adicionados assepticamente Solução de Sais 2% (v/v) e Solução de Elementos Traços 0,04% (v/v).

3.3. Soluções e Tampões

As soluções e tampões foram preparadas com água bidestilada ou Milli-Q autoclavada, e no caso de soluções para manipulação de RNA, com água tratada com DEPC, seguindo as recomendações de SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.3.1 Soluções para suspensão de esporos e cultivos de *M. anisopliae*

3.3.1.1 Tween 80

- Tween 80 0,01% (v/v)

3.3.1.2 Solução de Sais

- KCl 2,6% (p/v)
- MgSO₄.7H₂O 2,6% (p/v)
- KH₂PO₄ 7,6% (p/v)

A solução foi preparada e esterilizada em autoclave e adicionada assepticamente ao meio de cultura MCc.

3.3.1.3 Solução de Elementos Traços

- 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)

A solução foi preparada e esterilizada em autoclave e adicionada assepticamente ao meio de cultura MCc.

3.3.1.4 Solução de Glicose

- Glicose 50% (p/v)

A solução foi esterilizada por filtração com filtro de 0,45 µm e armazenada a 4°C.

3.3.1.5 Solução de N-acetilglicosamina

- N-acetilglicosamina 25% (p/v)

A solução foi esterilizada por filtração com filtro de 0,45 µm e armazenada a 4°C.

3.3.2 Soluções e tampões para a extração de ácidos nucleicos de *M. anisopliae*

3.3.2.1 Tampão de extração de DNA

- Tris-HCl pH 8,0 200 mM
- NaCl 250 mM
- EDTA 25 mM
- SDS 1% (v/v)

As soluções do tampão foram preparadas previamente em água destilada e esterilizadas em autoclave, com exceção do detergente SDS. A diluição para o preparo do tampão também foi feita em água destilada esterilizada em autoclave a 120°C.

3.3.2.2 Fenol

Para a extração de DNA genômico foi utilizado fenol ácido, sendo apenas hidratado com água bidestilada autoclavada. Para a extração de RNA, o fenol hidratado foi tamponado com Tris-HCl pH 8,0.

3.3.2.3 Fenol-clorofórmio

- Fenol : clorofórmio 1 : 1 (v/v)

3.3.2.4 Clorofórmio-álcool isoamílico

- Clorofórmio : Álcool isoamílico 24 : 1 (v/v)

3.3.2.5 TE

- Tris-HCL pH 8,0 10 mM
- EDTA pH 8,0 0,1 mM

3.3.2.6 Tampão de lise

- NaCl	600 mM
- EDTA	10 mM
- Tris-HCl pH 8,0	100 mM
- SDS	4% (v/v)

As soluções do tampão de lise foram preparadas previamente em água DEPC 1% e esterilizadas em autoclave, com exceção do detergente SDS. A diluição para o preparo do tampão também foi feita em água DEPC 1% esterilizada em autoclave a 120°C.

3.3.2.7 Cloreto de lítio

- LiCl	8 M
--------	-----

3.3.2.8 Água DEPC

- Dietilpirocarbonato	0,01% (v/v)
-----------------------	-------------

Foi utilizada água MilliQ para a preparação da água DEPC, mantendo o frasco a 37°C por aproximadamente 16 h e, após, esterilizado em autoclave a 120°C.

3.3.2.9 Solução de Acetato de sódio

- NaAc pH 5,2	3 M
---------------	-----

O pH foi ajustado para 5,2 com ácido acético glacial.

3.3.3 Soluções e tampões para análise de ácidos nucléicos por eletroforese em gel de agarose

3.3.3.1 TAE 1x

- Tris-acetato	40 mM
- EDTA	1 mM

3.3.3.2 TEB

- Tris-HCl	89 mM
- EDTA	2,5 mM
- H ₃ BO ₄	89 mM

3.3.3.3 Solução de brometo de etídio

- EtBr	1 mg/mL (p/v)
--------	---------------

3.3.3.4 Tampão de amostra para gel de agarose

- Azul de bromofenol	0,25%
- Xilene cianol FF	0,25%
- Ficoll 400	15%

3.3.4 Tampões e soluções para ensaios enzimáticos

3.3.4.1 Quitina Coloidal

Foram adicionados 20 gr de quitina cristalina em 500 mL de ácido clorídrico, agitando-se a 4°C por um período de 16h, e após, filtrou-se em lã de vidro. Adicionou-se etanol 50% (v/v), e a mistura foi mantida sob agitação por 30 min. Após repouso de 15h a 4°C, o precipitado foi lavado com água deslilada e centrifugado até atingir o pH 6,0. A quitina obtida foi liofilizada para uso, sendo utilizada na concentração de 1%.

3.3.4.2 Tampão acetato

- Solução estoque:

(A) Ácido acético 0,2 M (500 mL)

(B) Acetato de sódio 0,2 M (500 mL)

- Tampão Acetato pH 5,4 0,2 M

43 mL da solução B e 7 mL da solução A.

- Tampão Acetato pH 5,4 50 mM

25 mL de 0,2 M de Tampão Acetato pH 5,2 e 75 mL de água destilada.

3.3.4.3 Solução de ácido bórico

- Ácido bórico pH 9,1 0,8 M

O pH foi ajustado para 9, 1 com KOH 5 M.

3.3.4.4 Solução DMAB (p-Dimetilaminobenzaldeído) 10 X

- DMAB 1 g
- HCl 10 M 1,25 mL
- Ácido acético glacial qsp 10 mL

A solução de DMAB 10% foi diluída 10 vezes em ácido acético glacial para o uso.

3.3.4.5 Solução de DNS (Ácido 3,5-dinitrossalicílico)

- Ácido 2,5-dinitrosalicílico 3,53 g
- NaOH 6 g
- $\text{KNaC}_2\text{H}_4\text{O} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 102 g
- Fenol hidratado 2,53 mL
- Metassulfito de sódio 2,76 g
- Água destilada 472 mL

3.4. Cultivos de *M. anisopliae*

3.4.1 Cultivo de *M. anisopliae* em meio líquido

Para a extração de DNA de *M. anisopliae*, esporos foram inoculados (10^6 esporos·mL⁻¹) em meio MCc líquido (item 3.2.2) e incubado sob agitação de 150 rpm a 28°C durante 48 h.

3.4.2 Cultivo de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono ou substratos complexos

Para a extração de RNA total, *M. anisopliae* foi cultivado a partir de inoculo de $1 \cdot 10^6$ esporos $\cdot \text{mL}^{-1}$ em 50 mL de solução de 0,6 % de nitrato de sódio acrescido de uma das seguintes fontes de carbono: glicose 1%; N-acetilglicosamina (NacGlc) 0,25% ou 1%; quitina cristalina 1% (SIGMA); cutícula de carrapato *Boophilus microplus* 1% ou cutícula de *Dysdercus peruvianus* 1%. As culturas foram incubadas nos seguintes tempos: 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 e 72 horas. Os cultivos foram incubados a 150 rpm, 28°C. As culturas contendo glicose e NacGlc foram suplementadas a cada 16 h com o respectivo açúcar. Cada cultivo foi realizado em triplicata.

Após a incubação, os micélios foram coletados por filtração a vácuo, secos em papel Whatman nº1 e armazenados a -80°C.

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 16 horas, quando realizada a reposição do açúcar específico (NacGlc ou glicose) para posterior realização da determinação de açúcares redutores.

Os frascos utilizados (Elenmeyer de 250 mL), assim como a temperatura (28°C) e a velocidade de agitação (150 rpm) foram padronizados para que as condições oferecidas fossem mantidas durante todo o experimento.

3.5 Preparação de cutículas

Cutículas do carrapato *B. microplus* foram obtida a partir de teleóginas ingurgitadas, gentilmente cedidas pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Após cortar a extremidade anterior e a posterior dos carrapatos, o conteúdo interno 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 a 4°C.

Foram utilizados também insetos *D. peruvianus* cedidos gentilmente pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Célia Carlini do Centro de Biotecnologia da UFRGS. As cutículas foram obtidas a partir da retirada do conteúdo interno do inseto por centrifugação, posterior limpeza com auxílio de pinças e esterilização em autoclave (120°C durante 20 min) e armazenadas a 4°C.

3.6 Manipulação de ácidos nucleicos

3.6.1 Extração de DNA genômico de *M. anisopliae*

Aproximadamente 10^6 esporos·mL⁻¹ do fungo foram inoculados em 50 mL de meio de cultivo líquido MCc (item 3.2.2). O micélio foi coletado por filtração a vácuo, seco em papel Whatman nº1 e macerado em nitrogênio líquido até a condição de pó. Aproximadamente 1 g de micélio foi adicionada a um tubo eppendorf previamente preenchido com 0,2 mL de tampão de extração (item 3.3.2.1) e 0,2 mL de fenol:clorofórmio (item 3.3.2.3). A mistura foi fortemente agitada por 5 min e centrifugada por 10 min a 14.000 g para a separação das fases. A fase aquosa foi coletada para tubo limpo e re-extraída com 0,3 mL de fenol:clorofórmio (item 3.3.2.3). A mistura foi novamente centrifugada por 5 min a 14.000 g e a fase aquosa foi coletada para um tubo limpo.

O DNA foi precipitado com adição de NaCl 5 M para a concentração final de 200 mM e 2 volumes de etanol absoluto gelado, e mantido durante duas horas a -20°C. O DNA foi coletado por centrifugação (10.000 g, 20 min), seco e ressuspenso em 200 µL de tampão TE (item 3.3.2.5). Sua concentração foi estimada em espectrofotômetro $A_{260/280}$ (Ultrospec 2000 - UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech) e, com o auxílio de um marcador de tamanho de fragmentos de DNA, λ HindIII, após eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio.

3.6.2 Extração de RNA de *M. anisopliae*

Todos os tampões e soluções utilizados para preparação e manipulação de RNA foram preparados com água DEPC (item 3.3.2.8). 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 no item 4.2. O micélio foi pulverizado em nitrogênio líquido e transferido rapidamente para eppendorf previamente preenchido com 0,75 mL de tampão de lise (item 3.3.2.6) e 0,3 mL de fenol pH 8,0 (item 3.3.2.2). A mistura foi agitada levemente por 15 min e centrifugada por 10 min a 14.000 g. A fase aquosa foi extraída com 0,5 V de fenol tamponado (item 3.3.2.2) e 0,5 V de clorofórmio, sendo as fases separadas por centrifugação por 10 min a 10.000 g. A fase aquosa foi novamente transferida e foram adicionados 0,75 V de cloreto de lítio 8M (item 3.3.2.7). O conteúdo foi misturado e armazenado a 4⁰C durante 18 h, seguido de centrifugação por 10 min a 10.000 g. Os ácidos nucleicos sedimentados foram ressuspensos em 0,3 mL de água Milli Q tratada com DEPC estéril (item 3.3.2.8), 0,03 mL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (item 3.3.2.9) e 0,75 mL de etanol absoluto e precipitado por 1 h a -70⁰C. O material foi coletado por centrifugação por 10 min a 10.000 g, lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 30 µL de água DEPC (item 3.3.2.8). A concentração e a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

3.6.3 Eletroforese 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 (item 3.3.3.1), adicionando brometo de etídio (item 3.3.3.3) para a concentração final de 0,5 µg/mL. A eletroforese foi realizada em cubas contendo tampão TAE 1x (item 3.3.3.1), utilizando fontes Power PAC (Bio Rad), 2-5 V/cm.

Foi adicionado ao DNA a ser analisado, tampão de amostra (item 3.3.3.4) em uma concentração final de 1/10 do volume de 12 μ L. Após a eletroforese, o DNA foi visualizado em transiluminador 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).

Os mesmos procedimentos foram realizados para a visualização do RNA total, porém foi utilizado tampão TEB 0,5x (item 3.3.3.2), tanto para a preparação dos géis como para o preenchimento das cubas de eletroforese.

3.6.4 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 no item 3.6.4.1.

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

Componentes	Volume (μL)	Concentração
Tampão de reação	2,5	10x
MgCl ₂	1	50 mM
DNTPs	5	1 mM
Primer F	1,3	20 pmol/ μL
Primer R	1,3	20 pmol/ μL
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,5	5U
DNA molde	1-5	100-200 ng
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 25	

3.6.4.1 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos Chit1F e Chit1R e Chi2F e Chi2R (Tabela 2)

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

3.6.4.2 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos Chit3F e Chit3R (Tabela 2).

Condições: 94°C por 5 min, repetindo 30 vezes 94°C por 30 s, 55°C por 45 s, 72°C por 45 s, e por fim, 72°C por 2 min.

3.6.4.3 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos Tef1F e Tef1R (Tabela 2)

Condições: 94°C por 3 min, repetindo 30 vezes 94°C por 30 s, 58°C por 45 s, 72°C por 1 min, e por fim, 72°C por 5 min.

3.6.5 Oligonucleotídeos

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

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeo	Seqüência
chit1For	5' - GCTGTCTACTTCACCAATTG - 3'
chit1Rev	5' - CCACGTCCACCCTCCAAT - 3'
chit2For	5' - GCCCCCTTCAACTACAACAA - 3'
chit2Rev	5' - ACACATTGGTAAGGGGGAAC - 3'
Sexgi3F	5' - CCATGGAAATGTTTGTAGAAACGCACTAGC - 3'
chit3R	5' - TTGGTCATGGCGAGGTAAC - 3'
tef1F	5' - CTTCAAGTACGCATGGGTTC - 3'
tef1R	5' - CACATAGGCTTGGAGGGAAC - 3'

3.6.6 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, 1µL de enzima Dnase I (1 U/µL) e água DEPC suficiente para 10 µL. As amostras foram incubadas por 15 min a 37°C. A enzima foi inativada adicionando-se 1 µL de EDTA 25 mM e incubando por 10 min a 65°C.

Após o tratamento com a enzima, foi realizada uma reação de PCR em um total de 10 μL , com 0,5 μL de cada amostra de RNA, para a verificação da presença ou não de DNA genômico contaminante na amostra.

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

Os RNAs extraídos de *M. anisopliae* (item 3.6.2) cultivados em diferentes fontes de carbono, quantificados e tratados com enzima Dnase I (item 3.6.6), 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 os genes *chit1*, *chi2* e *chit3* (Tabela 2) de acordo com as condições já determinadas no item 3.6.4.

Para controle interno da reação foi utilizado o gene constitutivo *tef-1 α* (NAKAZATO *et al.*, 2006), com os oligonucleotídeos *tef1F* e *tef1R* (Tabela 2).

3.7 Ensaio enzimáticos

3.7.1 Quantificação de proteínas

O método de BRADFORD (1976) foi usado para quantificar as proteínas secretadas no meio de cultura. Foram adicionados á 800 μL de amostra, 200 μL

do reagente de BRADFORD (“Protein Assay, Bio Rad”). A mistura foi agitada vigorosamente e a seguir, foi procedida a leitura da absorbância a 595 nm. A curva-padrão foi construída com albumina sérica bovina (BSA), dissolvida em água destilada nas concentrações de 2,5 a 25 µg/mL (p/v).

3.7.2 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, NacGlc, 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 pH 5,4 (50 mM). As reações foram incubadas a 37°C durante 4 h, sob agitação branda. A reação foi centrifugada por 5 min a 2000 g. Do volume final de 1,5mL 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). 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. Para a curva padrão utilizou-se NacGlc nas concentrações de 25 a 1000 µM (p/v).

Uma unidade (U) de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de NacGlc por min por mL conforme as condições descritas acima. A atividade específica foi calculada pela relação entre atividade de quitinase (U) e proteína total (mg).

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).

3.7.3 Determinação de açúcar redutor

As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras de diferentes tempos de cultivo de *M. anisopliae* em meios contendo glicose e N-acetilglicosamina foram determinadas conforme modificações do método descrito por MILLER (1959). As reações continham 100 μ L de cada amostra e 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), fervendo-se por 3 min cada uma. A quantificação foi feita por medida em espectrofotômetro a 550 nm.

Para a curva padrão utilizou-se glicose e NacGlic nas concentrações de 10 a 100 μ g/mL (p/v).

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

4. RESULTADOS

4.1 Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em cultivos de *M. anisopliae*

Foi utilizada a técnica de RT-PCR para analisar os níveis de transcritos dos genes *chit1* (BOGO *et al.*, 1998), *chi2* (SCREEN & ST. LEGER, 2000; BARATTO *et al.*, no prelo) e *chi3* (SILVA *et al.*, 2005) de *M. anisopliae* linhagem E₆. Os RNAs foram extraídos de micélio da linhagem E₆, cultivados em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio e acrescido de uma das diferentes fontes de carbono: glicose 1%; N-acetilglicosamina (NacGlc) 0,25%; NacGlc 1%; quitina cristalina 1%; cutícula de carrapato *Boophilus microplus* 1% ou cutícula de inseto *Dysdercus peruvianus*. Foram testados os seguintes tempos de cultivo: 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 e 72 horas. Os cultivos com cutícula de carrapato e de inseto visam mimetizar as condições encontradas pelo fungo na penetração de seus hospedeiros. Estes modelos de estudo representam duas classes distintas de artrópodes, oferecendo, provavelmente, barreiras diferentes do tegumento para a penetração do fungo, apesar de ambos possuírem composição de sua cutícula semelhante.

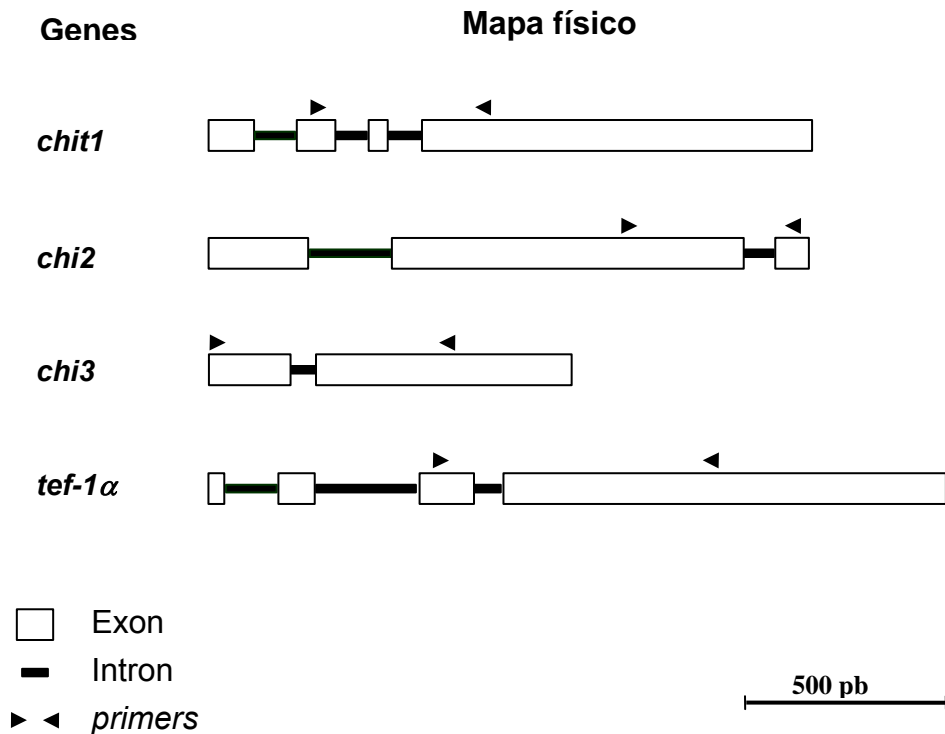
Todas as amostras de RNA extraídas foram tratadas com DNase livre de RNase (Invitrogen). Após o tratamento com a DNase as amostras foram visualizadas em gel de agarose para verificar a presença de DNA contaminante e todas as amostras foram testadas por PCR na ausência de Transcriptase Reversa, indicando assim a ausência de DNA na amostras de RNA. A síntese de primeira fita de cDNA foi realizada e seguida das reações de PCR com *primers* específicos para cada gene de quitinase (genes: *chit1*, *chi2* e *chi3*). Como controle interno, para padronizar a quantidade de RNA de cada condição de cultivo, foi utilizada a amplificação do gene *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 sempre flanqueando introns de forma a permitir a identificação de amplicons gerados a partir da cópia genômica ou de mRNA para cada gene. A Tabela 3 mostra os tamanhos esperados dos amplicons e a Figura 7 mostra a posição dos *primers* nos genes utilizados

É importante ressaltar que para os genes *chi2* e *chi3* foi observada a presença de transcritos não completamente processados. Nestes transcritos ocorre retenção de um dos íntrons, sendo no caso do gene *chi2* o menor deles. A retenção destes íntrons nos transcritos dos genes *chi2* e *chi3* foi demonstrada por sequenciamento dos cDNAs gerados. Estes transcritos não completamente processados foram originalmente descritos para o gene *mco* no fungo *Phanerochaete chrysosporium* (LARRONDO *et al.*, 2004) e denominados de processamento alterado. Em nosso laboratório este tipo de processamento foi demonstrado e está sendo estudado (Juliano Boldo e Charley Staats, comunicação pessoal).

Tabela 3. Tamanho dos amplicons gerados para cada um dos genes *chit* e *tef-1 α* de *M. anisopliae*, para as cópias genômica e de cDNA.

Genes alvo	Amplicon (pb)	
	Genômico	mRNA
<i>chit1</i>	400	230
<i>chi2</i>	511	439
<i>chi3</i>	560	500
<i>tef-1α</i>	1200	1031



Staats, C. C.

Figura 7. Mapa físico da região codificante dos genes *chit1*, *chi2*, *chi3* e *tef-1α* de *M. anisopliae*. Éxons estão representados por quadrados brancos e os íntrons, por traços pretos. As flechas indicam a posição relativa dos *primers* utilizados nos RT-PCR (figura cedida por Charley Staats).

4.1.1 Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em cultivos contendo glicose 1%

Foi possível detectar a presença dos transcritos do gene *chit1* em cultivos com glicose e seu acúmulo com o aumento do tempo de cultivo (Figura 8).

O perfil de transcrição observado para o gene *chi2* mostrou-se variável. Os transcritos parcialmente processados podem visualizados nos tempos de 24, 64 e 72 horas, enquanto que os transcritos totalmente processados aparecem somente

em 32, 40, 48 e 56 horas de cultivo. Da mesma forma nos transcritos do gene *chi3*, a forma parcialmente processada aparece para todos os transcritos, enquanto que a forma completamente processada parece aumentar sua transcrição a partir de 16 horas, e tende a desaparecer a partir de 64 horas de cultivo.

Apesar do tratamento das amostras com DNase e dos controles sem transcriptase reversa, nos cultivos de 24, 64 e 72 horas, parece haver contaminação de DNA genômico quando se observa os géis para os genes *chi2* e *chi3*. Porém a contaminação não está evidente nos géis para os genes *chit1* e *tef1 α* .

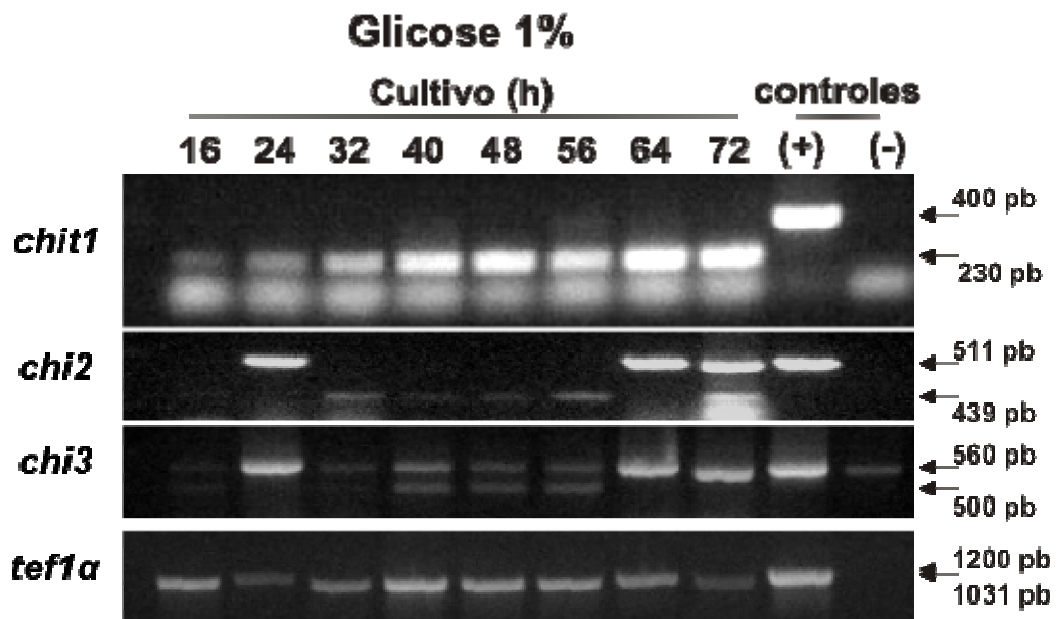


Figura 8. Nível de transcritos dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* de *M. anisopliae* em cultivos com glicose 1%. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de reação de RT-PCR realizada com utilização de oligonucleotídeos específicos para os genes *chit1*, *chi2*, *chi3* e *tef-1 α* (controle interno). As canaletas contêm respectivamente cultivo de: 16h; 24h; 32h; 40h; 48h; 56h; 64h; 72h; controle da amplificação (+) utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; e (-) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.1.2 Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em cultivos contendo N-acetilglicosamina 0,25%

Nos cultivos realizados com NacGlc 0,25% (Figura 9) ocorreu o aumento na transcrição do gene *chit1* a partir de 24 horas permanecendo constante até 40 horas. A partir de 48 horas ocorreu aumento nos níveis de transcrição que permaneceram constantes até 64 horas de cultivo.

O perfil de transcrição observado para o gene *chi2* mostrou-se muito variável. Exceto para o cultivo por 16 horas, o transcrito parcialmente processado, amplicon de 511 pb, foi detectado em todos os tempos analisados, mostrando níveis variados. Embora em alguns tempos de cultivo o transcrito completamente processado, amplicon de 439 pb, esteja presente em níveis muito baixos, nos tempos de 24 e 56 horas, este transcrito está claramente presente. Em 32 e 64 horas de cultivo baixos níveis de transcritos foram observados.

Para o gene *chi3*, não há variação da transcrição quando se observa os transcritos completamente processados (amplicon de 500 pb), porém, são observados transcritos não completamente processados (amplicon de 560 pb), nos tempos de 32, 40 e 64 horas de cultivo.

No cultivo de 72 horas, há provável contaminação com DNA genômico e o resultado não foi considerado.

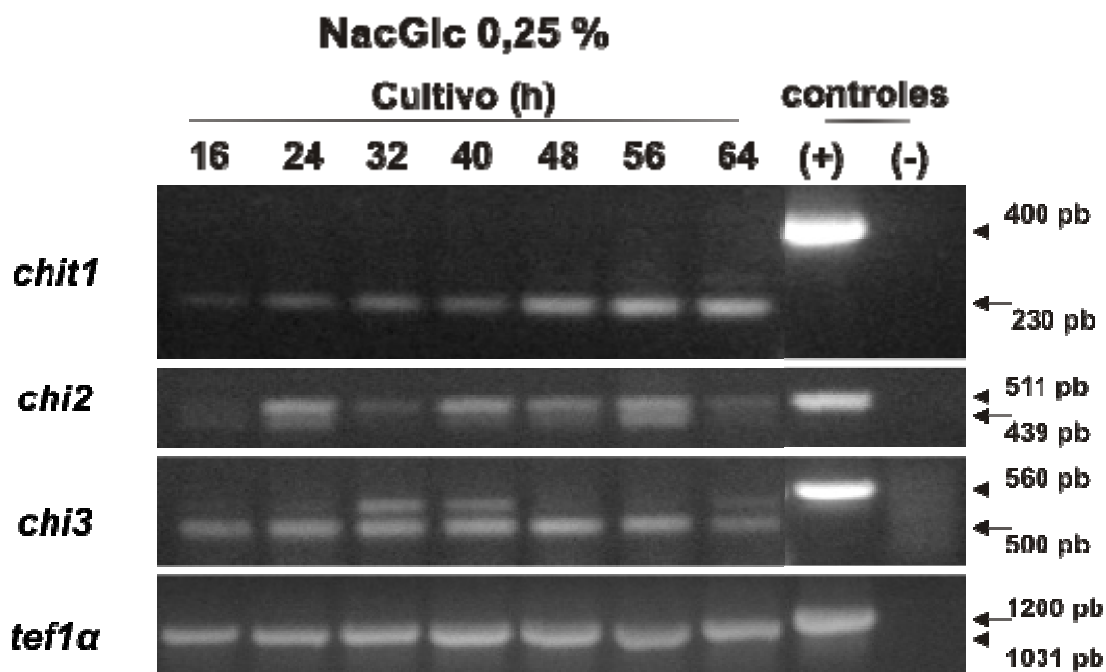


Figura 9. Nível de transcritos dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* de *M. anisopliae* em cultivos com N-acetilglicosamina 0,25%. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de RT-PCR realizada com utilização de oligonucleotídeos específicos para os genes *chit1*, *chi2*, *chi3* e *tef-1 α* (controle interno). As canaletas contêm respectivamente cultivo de: 16h; 24h; 32h; 40h; 48h; 56h; 64h; 72h; controle da amplificação (+) utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; e (-) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.1.3 Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em cultivos contendo N-acetilglicosamina 1%

Foi possível detectar aumento dos níveis de transcrição para o gene *chit1* com o aumento do tempo de cultivo em presença de NacGlc 1% (Figura 10).

Os níveis de transcritos observados para o gene *chi2* variaram, sendo detectado o aumento do transcrito não completamente processado (amplicon de 511 pb) a partir de 24 horas de cultivo. O transcrito completamente processado foi detectado (amplicon de 439 pb) em 40, 48 e 72 horas de cultivo.

Para o gene *chi3* as duas espécies de transcritos foram detectadas (amplicons de 560 e 500 pb) em todos os tempos de cultivo. No tempo de 32 horas observou-se um aumento dos níveis do transcrito parcialmente processado.

Nos cultivos de 56 e 64 horas, há provável contaminação com DNA genômico e os resultados não foram considerados.

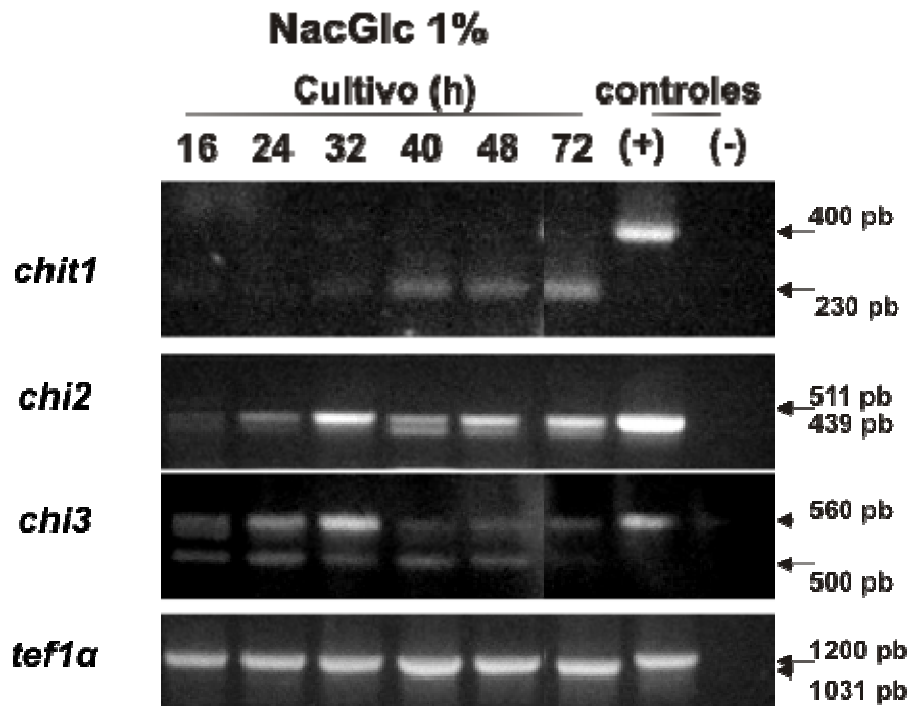


Figura 10. Nível de transcritos dos genes *chi1*, *chi2* e *chi3* de *M. anisopliae* em cultivos com N-acetilglicosamina 1%. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de reação de RT-PCR realizada com utilização de oligonucleotídeos específicos para os genes *chi1*, *chi2*, *chi3* e *tef-1α* (controle interno). As canaletas contêm respectivamente cultivo de: 16h; 24h; 32h; 40h; 48h; 56h; 64h; 72h; controle da amplificação (+) utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; e (-) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.1.4 Análise do padrão de expressão dos genes *chi1*, *chi2* e *chi3* em cultivos contendo quitina cristalina 1%

Os resultados de RT-PCR para o gene *chi1* nos cultivos em quitina cristalina mostraram contaminação com DNA genômico, portanto não estão apresentados.

Um aumento da transcrição pode ser observado no gene *chi2* (Figura 11) a partir de 40 horas de cultivo na presença de quitina cristalina, tanto nos transcritos processados quanto nos não processados.

Para o gene *chi3*, ocorreu aumento do nível de transcritos a partir de 40 horas de cultivo. Em 48h de cultivo há uma diminuição brusca nos níveis de transcritos. Não se pode observar transcritos não processados para o gene *chi3*.

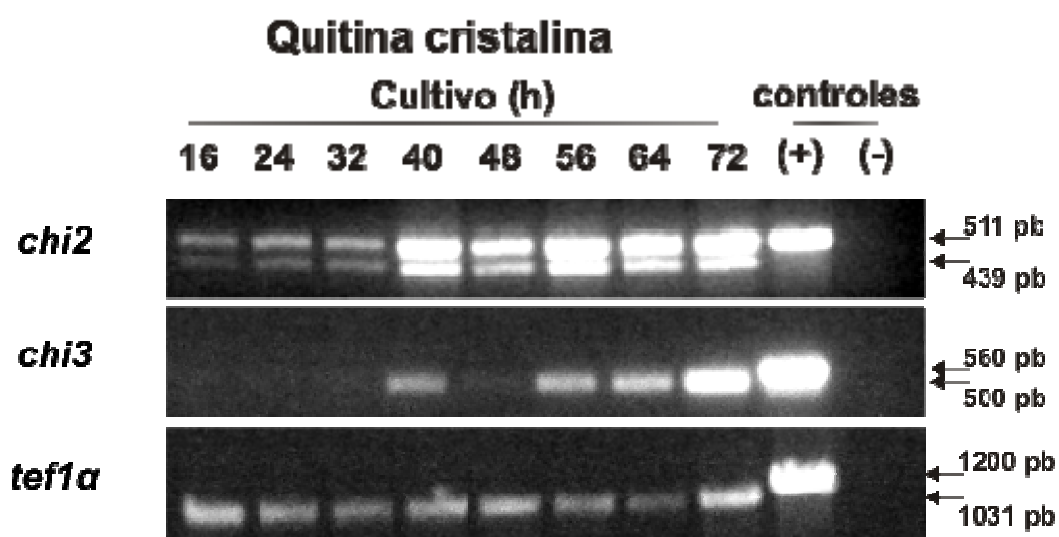


Figura 11. Nível de transcritos dos genes *chi2* e *chi3* de *M. anisopliae* em cultivos com quitina cristalina 1%. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de reação de RT-PCR realizada com utilização de oligonucleotídeos específicos para os genes *chi2*, *chi3* e *tef-1α* (controle interno). As canaletas contêm respectivamente cultivo de: 16h; 24h; 32h; 40h; 48h; 56h; 64h; 72h; controle da amplificação (+) utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; e (-) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.1.5 Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em cultivos contendo cutícula de *Boophilus microplus* 1%

Observa-se um aumento gradual dos transcritos do gene *chit1* com o aumento do tempo de cultivo na presença de cutícula de carrapato. Os transcritos estão presente desde o início (16 horas) dos cultivos (Figura 12).

Nestas condições os transcritos do gene *chi2* mostram um perfil variável. No tempo de 24 horas de cultivo foi detectado o transcrito não processado (amplicon de 511pb). Os transcritos somente foram detectados novamente a partir de 56 horas de cultivo estando as duas espécies de transcritos presentes.

Em relação aos transcritos do gene *chi3* nos tempos de cultivo até 48 horas as duas espécies de transcritos estão presentes. O transcrito parcialmente processado (amplicon de 560 pb) tende a desaparecer a partir de 56 horas de cultivo.

No cultivo de 72 horas, há provável contaminação com DNA genômico, portanto o resultado não foi considerado.

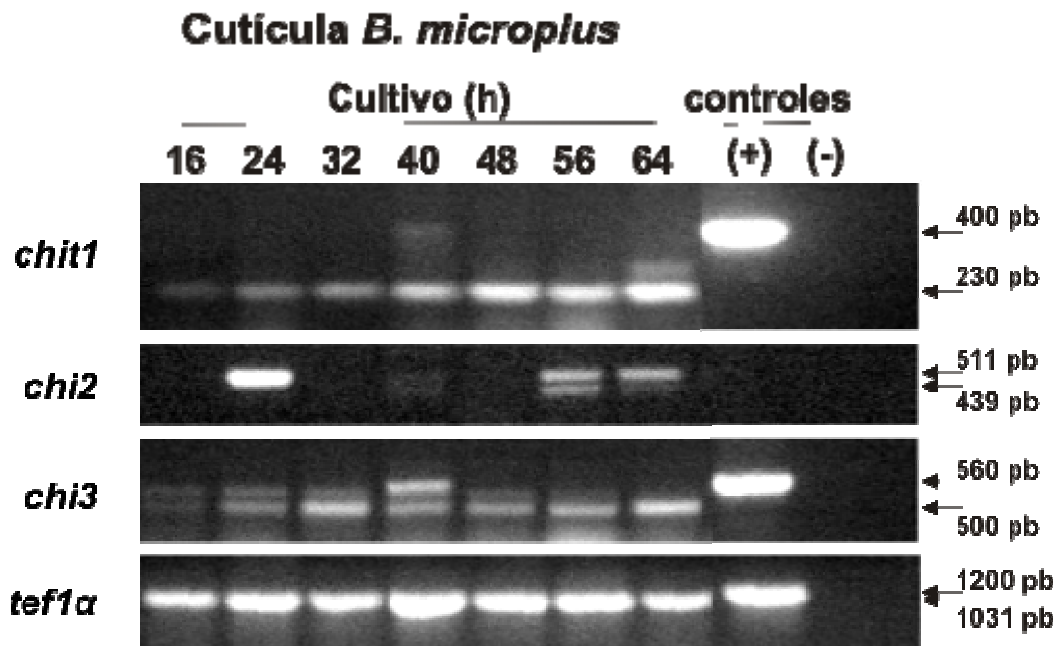


Figura 12. Nível de transcritos dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* de *M. anisopliae* em cultivos com cutícula de *Boophilus microplus* 1%. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de reação de RT-PCR realizada com utilização de oligonucleotídeos específicos para os genes *chit1*, *chi2*, *chi3* e *tef-1α* (controle interno). As canaletas contêm respectivamente cultivo de: 16h; 24h; 32h; 40h; 48h; 56h; 64h; 72h; controle da amplificação (+) utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; e (-) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.1.6 Análise do padrão de expressão dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em cultivos com cutícula de *Dysdercus peruvianus* 1%

Ocorre um aumento gradual nos transcritos referentes ao gene *chit1*, a partir do tempo de cultivo de 16 horas na presença de cutícula de *D. peruvianus*. O mesmo ocorre em relação aos transcritos do gene *chi2*. Entretanto neste caso os transcritos somente são detectados a partir de 32 horas de cultivo e o aumento dos níveis destes transcritos é maior e são majoritariamente da espécie não completamente processada (amplicon de 511 pb). O transcrito completamente processado (amplicon de 439 pb) também somente é fracamente detectado a

partir de 32 horas de cultivo permanecendo constante nos tempos de cultivo maiores.

Um aumento da transcrição pode ser observado para o gene *chi3* a partir de 56 horas de cultivo para a espécie não processada. Já o transcrito completamente processado se mantém fracamente constante até 48 horas de cultivo e tende a desaparecer a partir de 56 horas de cultivo.

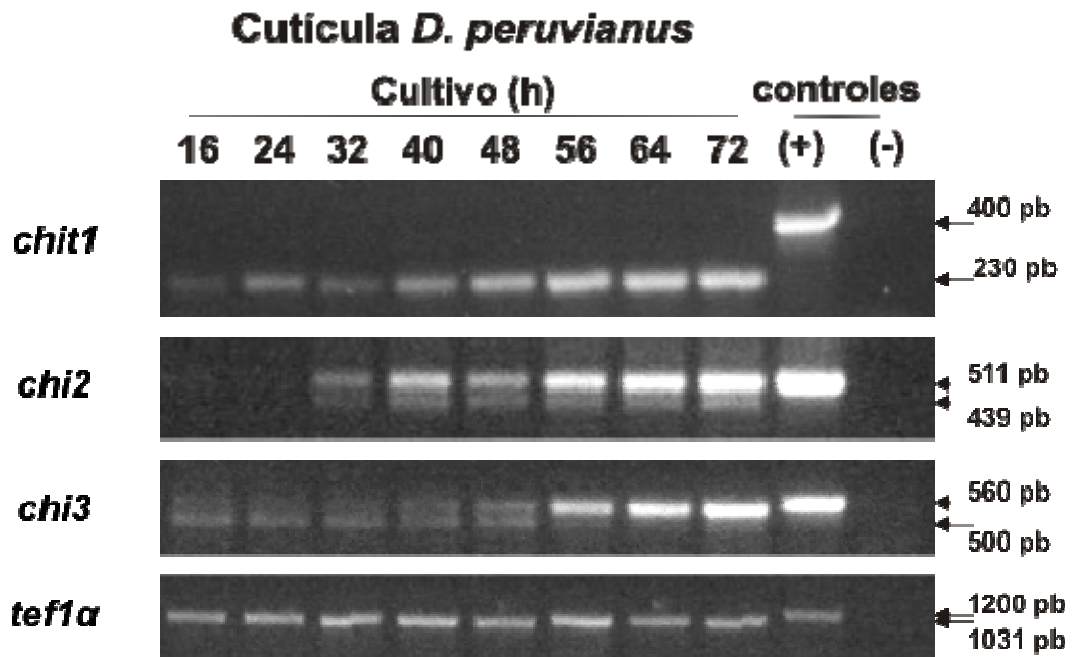


Figura 13. Nível de transcritos dos genes *chit1*, *chi2* e *chi3* de *M. anisopliae* em cultivos com cutícula de *Dysdercus peruvianus* 1%. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de reação de RT-PCR realizada com utilização de oligonucleotídeos específicos para os genes *chit1*, *chi2*, *chi3* e *tef-1α* (controle interno). As canaletas contêm respectivamente cultivo de: 16h; 24h; 32h; 40h; 48h; 56h; 64h; 72h; controle da amplificação (+) utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; e (-) controle negativo da reação sem DNA molde.

4.2 Análise da produção de quitinases e do consumo de açúcares em sobrenadantes de culturas com diferentes substratos

Com o propósito de analisar a produção de quitinases e o consumo de açúcares em sobrenadantes de culturas de *M. anisopliae*, foram realizadas a determinação da atividade específica de quitinases e a determinação de açúcares redutores totais. Foram utilizadas as mesmas culturas que forneceram o micélio para a extração de RNA. Os resultados da atividade específica de quitinases nos sobrenadantes das culturas estão representados graficamente na Figura 14.

Na presença de glicose 1% (Fig. 14 A) a atividade de quitinase se manteve baixa, havendo um pequeno aumento no cultivo de 24 horas. Na presença de NacGlc 0,25% (Fig. 14 B) podemos observar uma alta atividade de quitinases, sendo os maiores níveis nos tempos de 40 e 56 horas de cultivo, ocorrendo uma quebra brusca da atividade no tempo de 48 horas. Na presença de NacGlc 1% (Fig. 14 C) foram encontrados os níveis mais altos de atividade, entre todos os substratos testados. Os maiores picos de atividade ocorrem em 40 e 56 horas de cultivo. Nos sobrenadantes dos cultivos com substratos complexos a atividade específica de quitinases, na cultura com quitina cristalina 1% (Fig. 14 D), é a mais baixa quando comparada com outras fontes de carbono, excetuando-se a glicose 1%. Somente em 64 horas de cultivo há um aumento da atividade, porém logo em seguida ela tende a baixar. Nas culturas com cutícula de *B. microplus* 1% (Fig. 14 E) a atividade também é baixa, havendo aumento em 24 horas, uma diminuição em 32 horas seguida de um aumento gradativo até 72 horas de cultivo. Nas culturas com cutícula de *D. peruvianus* 1% (Fig. 14 F) a atividade específica de quitinase é mais elevada no início do cultivo, decrescendo até 40 horas, seguida de um aumento com um pico de atividade no tempo de 48 horas. A atividade decai até 56 horas e a partir de 64 horas novamente se eleva.

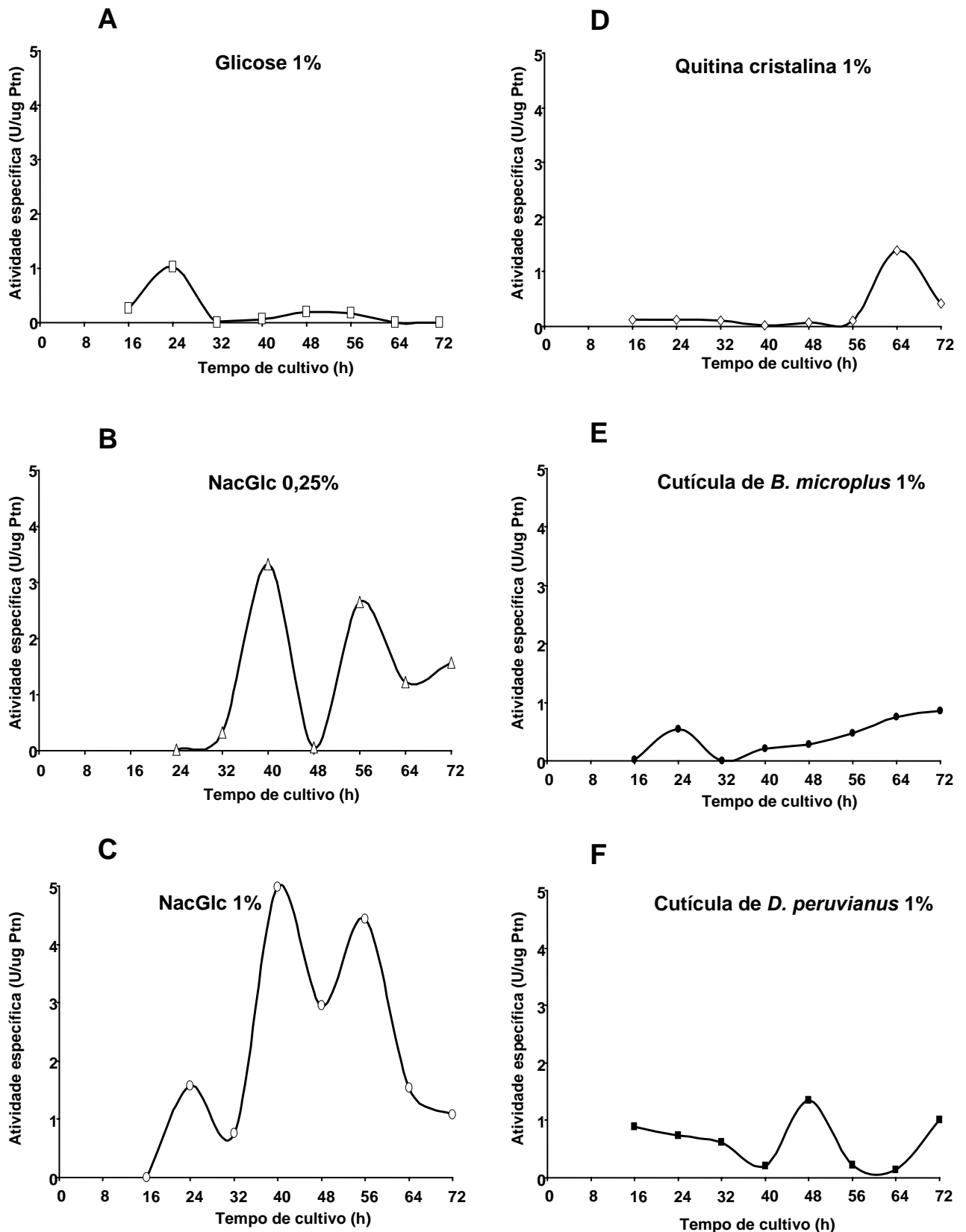


Figura 14. Atividade específica de quitinases em sobrenadantes de cultivos de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos. (A) cultivo em glicose 1%; (B) cultivo em NacGlc 0,25%; (C) cultivo em NacGlc 1%; (D) cultivo em quitina 1%; (E) cultivo em cutícula de *B. microplus* 1% e (F) cultivo em cutícula de *D. peruvianus* 1%. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética. Os valores dos desvios padrão não foram significativos, portanto não aparecem no gráfico.

Para verificar o consumo de açúcares durante o cultivo, a concentração de açúcares redutores foi determinada em alíquotas do sobrenadantes dos cultivos após a reposição dos açúcares, que ocorria a cada 16 horas (Figura 15). Não foi possível determinar a concentração de açúcares no tempo de 48 horas no cultivo com NacGlc 1%, portanto este aparece interrompido no gráfico.

Nos cultivos na presença de glicose, observamos a maior quantidade de açúcares quando comparada com os demais cultivos. Os maiores níveis de açúcares redutores são encontrados em 40, 64 e 72 horas. Na presença de NacGlc 0,25% pode-se observar baixa quantidade de açúcares redutores, porém a partir de 56 horas de cultivo seu nível tende a aumentar gradualmente. Na presença de NacGlc 1% observamos a quantidade de açúcares se mantém estável até 32 horas, aumentando um pouco em 40 horas de cultivo. Podemos observar que a partir de 56 horas de cultivo há maior acúmulo deste açúcar.

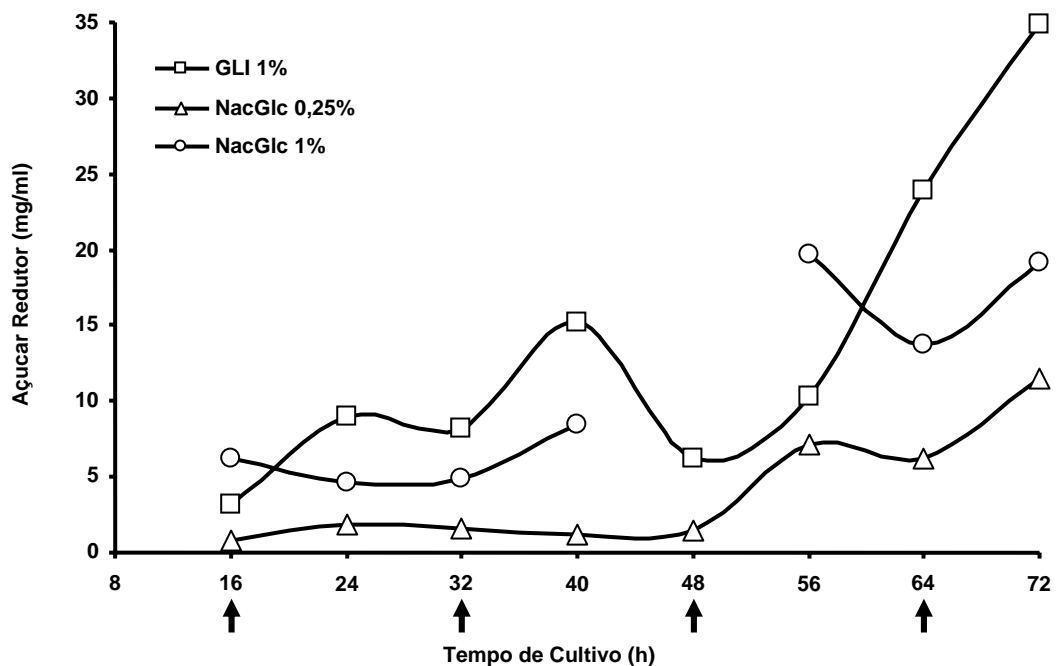


Figura 15. Determinação de açúcares redutores em cultivos de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono. A cada 16 horas (setas) os açúcares foram repostos nas culturas. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética. Os valores dos desvios padrão não foram significativos, portanto não aparecem no gráfico.

DISCUSSÃO

O entendimento dos mecanismos básicos do processo de infecção de *Metarhizium 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 (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; BOGO *et al.*, 1998; GIMÉNEZ-PECCI *et al.*, 2002). Alguns genes e enzimas têm sido caracterizados e estudados em termos de sua 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.

As quitinases, além de contribuir para a arquitetura da parede celular nos fungos filamentosos, possuem a função de aquisição de nutrientes (SILVA *et al.*, 2005). Não se tem ainda uma visão clara de como esses processos ocorrem em fungos entomopatogênicos. Em *Metarhizium* várias quitinases foram caracterizadas e pelo menos três genes *chit* foram identificados. Esses diferentes genes *chit* produzem quitinases que atuam em processos específicos? Ou seja, determinada quitinase participa da morfogênese da parede celular e outra quitinase participa do processo de infecção ou da aquisição de nutrientes? Estas perguntas só poderão ser respondidas quando tivermos melhor conhecimento básico sobre estes genes e estas enzimas. Assim, no presente trabalho, procuramos verificar como ocorre a expressão (transcritos) dos três genes *chit* caracterizados em relação ao tempo de cultivo e na presença de substratos simples (glicose e GlcNac) e substratos complexos (quitina ou cutícula), utilizando-se da técnica de RT-PCR.

A técnica de RT-PCR revolucionou a análise de expressão gênica, por ser possível, atualmente, detectar transcritos de qualquer gene indiferentemente da quantidade inicial de mRNA. A técnica consiste na produção de simples fita de DNA a partir de um RNA utilizando-se da enzima Transcriptase Reversa, seguida de amplificação exponencial por PCR (SHARKEY *et al.*, 2004). A detecção de mRNA, que normalmente tem meia vida curta, indica a expressão de

determinados genes no momento específico em determinada amostra ou condição de estudo. A técnica tem sido bastante utilizada em experimentos de expressão gênica de fungos e outros microrganismos durante seu processo de infecção e em expressão de bactérias em ambientes aquáticos ou terrestres (SHELBURNE & MUSSER, 2004; SHARMA *et al.*, 2005).

No presente trabalho podemos observar que o gene *chit1* apresenta um aumento gradativo dos níveis de transcrição com o aumento do tempo, a partir de 40 e 48 horas de cultivo e em todas as condições. Estudos anteriores (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005) mostram que na presença de glicose ocorre repressão da secreção de quitinases de *M. anisopliae*, diferentemente do que encontramos neste estudo para o gene *chit1*, já os transcritos dos genes *chi2* e *chi3* estão fracamente expressos. Resultados semelhantes aos nossos também foram demonstrados por BARATTO (2005) onde, em cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose, não ocorre a repressão dos transcritos do gene *chit1*. Também, diferentemente do que era esperado (BARRETO *et al.*, 2004), não houve repressão da transcrição deste gene na presença de altas (1%) concentrações de NacGlc, apesar de fraca, há indução a partir de 40 horas de cultivo. Já em relação aos cultivos em NacGlc em baixas (0,25%) concentrações, em cutícula de inseto e carrapato e em quitina cristalina, a indução ocorreu como descrito anteriormente (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Porém, os resultados dos ensaios de atividade de quitinase mostraram baixa atividade nos sobrenadantes de cultivo de glicose, estando o sistema em repressão devido á constantes reposições de glicose durante os cultivos. Essa estratégia experimental foi utilizada para que mesmo com o consumo do açúcar pelo fungo em desenvolvimento, este sempre estivesse disponível em concentrações suficientes para reprimir o sistema.

Embora, quando comparados, os dados dos níveis de transcrição dos genes *chit* e as atividades enzimáticas em sobrenadantes de cultura (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004) pareçam discrepantes, devemos sempre levar em conta que diferentes níveis de controle da expressão gênica podem estar envolvidos. Assim, não necessariamente alterações nos

níveis de transcritos se reflitam imediatamente nas atividades de quitinase nos sobrenadantes das culturas.

BOLDO (comunicação pessoal) demonstrou que os transcritos não processados do gene *chi2* podem ser provenientes de processamento alterado (*altered splicing*), como o que foi descrito para genes *mco* em *Phanerochaete chrysosporium* (LARRONDO *et al.*, 2004). No processamento alterado pode-se encontrar diferentes espécies de transcritos de um mesmo gene. Assim, duas populações de cDNA podem ser detectadas, uma derivada do RNA do gene *chi2* totalmente processado e outra onde o íntron de menor tamanho é retido. Os autores sugerem que transcritos provindos de processamento alterado podem possuir íntrons contendo codóns de parada, os quais podem levar ao término da tradução. Desta maneira, proteínas truncadas, se sintetizadas, podem não apresentar atividade enzimática devido à falta de resíduos importantes de aminoácidos (LARRONDO *et al.*, 2004). Através do seqüenciamento do gene *chi2*, seqüência obtida de produto de RT-PCR com primers específicos *chit2For* e *chit2Rev* purificado, foi demonstrada a retenção do segundo intron (Juliano Boldo, comunicação pessoal), semelhante ao descrito em *P. chrysosporium* (LARRONDO *et al.*, 2004).

O gene *chi2* teve seus transcritos detectados em todas as condições de cultivo, com exceção dos cultivos em glicose 1%, onde aparecem fracamente expressos, sugerindo que este açúcar reprime o sistema quitinolítico como anteriormente proposto (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Assim como para o gene *chi2*, no gene *chi3*, observamos as duas espécies de transcritos (processado e não processado), em todas as condições de cultivo estudadas, com exceção de cultivos em presença de quitina cristalina. Estas espécies de transcritos para o gene *chi3* a partir de um cDNA, são observadas pela primeira vez neste trabalho. Através do seqüenciamento de produto de RT-PCR utilizando primers específicos para o gene *chi3*, analisamos que o transcrito não processado possui o íntron em sua seqüência, portanto parece se tratar de duas formas de mRNA, já que testes para verificar a contaminação da amostra

com DNA genômico foram realizados após o tratamento dos cDNAs com enzima DNase. Estas duas espécies de transcritos do gene *chi3* também podem resultar de “processamento alterado”, porém outros experimentos devem ser realizados para confirmar esta hipótese, como por exemplo a técnica de Northern blot.

Nos cultivos com glicose e NacGlc 1% os dois transcritos do gene *chi3* possuem os mesmos níveis (intensidade da banda), o que não ocorre na presença de cutícula de *B. microplus* e NacGlc 0,25%, o que pode estar relacionado com o tempo e o meio de cultivo oferecidos. Nos cultivos com cutícula de *D. peruvianus* há um aumento gradual nos transcritos não processados, assim como ocorreu para os transcritos do gene *chi2* nesta e em outras condições de cultivo.

Nos estágios iniciais de cultivo os genes *chit1*, *chi2* e *chi3* (este somente nos cultivos com glicose, quitina cristalina e cutícula de *D. peruvianus*), não tiveram seus transcritos detectados (ou foram fracamente detectados), corroborando com resultados anteriores que indicam que as quitinases são expressas nos estágios tardios de cultivo (BOGO *et al.*, 1998; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2004). Em alguns dos cultivos ocorre aumento transcrição a partir de 48 horas, isso seria esperado já que este é o período das etapas do processo de infecção de *M. anisopliae* em que ocorre a secreção das enzimas tardias (quitinases - que são secretadas após as proteases) e a etapa de colonização.

SEIDL e colaboradores (2005) analisaram transcritos de genes de quitinases de *Hypocrea atroviridis* (forma anamórfica: *Trichoderma reesei*) sob diversas condições de indução de quitinases e micoparasitismo. Cinco genes novos estudados por este grupo em *H. atroviridis* (*chi18-2*, *chi18-3*, *chi18-4*, *chi18-10* e *chi18-13*) mostraram variação na regulação quando na presença ou ausência de diferentes fontes de carbono como NacGlc, glicose, quitina coloidal, parede celular de *Rhizoctonia solani*, assim como em experimentos de confronto (biocontrole/micoparasitismo) entre o fungo hospedeiro *R. solani* e *H. atroviridis*. Nestes experimentos de RT-PCR os autores utilizaram como controle da quantidade de RNA o gene constitutivo *tef-1 α* .

Assim como no caso dos genes *chi2* e *chi3* de *M. anisopliae* estudados no presente trabalho, nos experimentos de RT-PCR realizados por SEIDL e colaboradores (2005) em *H. atroviridis* foi observada a presença de duas bandas de cDNA de diferentes tamanhos (para os genes *chi18-3* e *chi18-13*). Realizando-se seqüenciamento da banda maior mostrou que esta ainda continha íntrons. Testes de contaminação também foram realizados, obtendo resultados negativos para a presença de DNA genômico. Portanto concluíram que há presença de duas espécies de mRNA. Porém a presença das duas espécies de mRNA não apareceram em todos os cultivos. Em presença de glicose, para o gene *chi18-13* observou-se somente a presença da forma não processada de mRNA, enquanto que nas outras condições a forma processada foi a predominante. Esse fato sugere que possam ocorrer mecanismos de regulação pós-transcricionais para o gene *chi18-13*. Similarmente, para o gene *chi18-3*, o número de transcritos que sofreram e que não sofreram processamento também depende das condições de cultivo (SEIDL *et al.*, 2005).

Estes estudos mostraram pela primeira vez que uma regulação pós-transcricional está envolvida na expressão de quitinases (SEIDL *et al.*, 2005). Assim como em *H. atroviridis*, podemos sugerir que em *M. anisopliae* pode haver a presença de diferentes espécies de mRNA, e sua ocorrência seja influenciada pelas condições e tempo de cultivo.

No presente trabalho observamos que em todos os cultivos com todas as fontes de carbono para os genes *chi2* e *chi3* há a presença de transcritos processados e não processados. Porém isso não ocorre para o gene *chi3* na presença de quitina cristalina, o mesmo que foi observado em cultivos de *H. atroviridis* para o gene *chi18-13* na presença de glicose e parede celular e fungo (SEIDL *et al.*, 2005). Isso pode sugerir que o gene *chi3* apresente o padrão esperado de transcrição quando em presença de quitina, ou seja, ocorre a excisão de íntrons, diferentemente do que ocorre na presença das demais fontes de carbono.

Nos cultivos realizados na presença de quitina podemos observar um aumento dos níveis de transcritos do gene *chi3* entre 40 e 72 horas de cultivo. Entretanto, na cultura de 48 horas não são detectados transcritos do gene *chi3*.

Na literatura pudemos encontrar outros trabalhos utilizando a técnica de Northern blot para caracterizar transcritos em fungos com resultados semelhantes. Nestes trabalhos transcritos específicos tem desaparecimento repentino em um determinado tempo de cultivo, reaparecendo em tempos mais elevados. Nenhum desses autores encontrou explicação para este tipo de ocorrência (IKE *et al.*, 2005; GREENSTEIN *et al.*, 2006). No presente trabalho pôde-se observar que transcritos medidos nas mesmas condições para genes diferentes não apresentaram esta redução, em princípio, descartando a possibilidade de erro experimental grosseiro. Entretanto, não pudemos realizar um número adequado de repetições (três) que permitisse concluir com mais segurança a validade destes dados. Outros experimentos devem ser realizados para esclarecer esta questão, em especial a validação por um número maior de repetições biológicas.

Alguns autores afirmam que apesar da técnica de RT-PCR ser muito usada para a detecção de transcritos relativamente raros, a metodologia não estima a quantidade exata de níveis de transcritos realmente presentes na reação. Como no caso dos produtos de PCR serem detectados em gel, a intensidade das bandas pode não ser diretamente proporcional à quantidade inicial de molde na reação, fazendo com que a análise da imagem seja duvidosa (WHELAN *et al.*, 2003). Porém, no presente trabalho, os genes que analisamos produziram quantidades de transcritos muito baixas para que os transcritos fossem detectados pela técnica de Northern e, portanto, optou-se pela técnica de RT-PCR. Para o presente trabalho foram extraídos vinte e quatro RNAs para cada uma das seis fontes de carbono citadas. As extrações de todas as amostras de RNAs foram realizadas em triplicata assim como seus respectivos cDNAs. Porém durante a padronização das quantidades de cDNA a serem adicionadas para as reações de PCR, aquelas condições de menor tempo de cultivo (16, 24 e 32 horas) apresentaram baixas quantidades de cDNA, devidas as baixas quantidades de RNAs específicos. Este fato fez com que a quantidade de cDNA obtida, não fosse suficiente para realizar todas as reações de PCR com os três genes estipulados. A dificuldade de obter grandes quantidades de RNA levou, ao final de todos os experimentos, a obtenção de apenas uma reação de RT-PCR para cada um dos genes mencionados e não três como era o previsto, para que

se pudesse comparar e confirmar, com as triplicatas, os resultados obtidos. Contudo, futuramente pretende-se realizar estas repetições para que possamos confirmar todos os resultados obtidos até o momento.

Para verificar a produção de quitinases em sobrenadantes de culturas de *M. anisopliae*, foi realizada a determinação da atividade específica de quitinases. Os resultados destes ensaios mostraram que ocorreu um aumento na atividade em todos os sobrenadantes analisados, quando comparados o tempo inicial de cultivo e o tempo final, exceto os cultivos em glicose, onde ocorreu a diminuição da atividade de quitinase. O aumento na atividade quitinolítica é esperado já que na presença de quitina, NacGlc 0,25%, cutícula de *B. microplus* ou cutícula de *D. peruvianus*, ocorre a indução de quitinases, como anteriormente demonstrado (BARRETO *et al.*, 2004).

Apesar de haver diferenças nos níveis de quitinases secretadas nos diferentes cultivos realizados, pudemos observar que há um padrão semelhante entre o aumento e a diminuição da secreção destas enzimas nos cultivos de NacGlc 0,25% e NacGlc 1%, assim como entre os cultivos com glicose e cutícula de *B. microplus*. Esses padrões de aumento e diminuição da atividade ao longo do tempo de cultivo mostram alguma semelhança com os dados discutidos anteriormente referentes aos níveis de transcritos encontrados. Entretanto, como também enfatizado anteriormente, mais experimentos são necessários para validar estas observações.

Comparando aqui os resultados dos ensaios de atividade específica de quitinases com os níveis de transcritos (RT-PCR), nos cultivos na presença de glicose, observamos que o sistema está reprimido como relatado anteriormente (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005), pois a atividade enzimática é baixa assim como a expressão dos genes *chi2* e *chi3*. Porém isso não ocorre para os transcritos do gene *chit1*. Nos cultivos na presença de NacGlc 0,25% verificamos que o padrão dos transcritos para os três genes de quitinases é elevado, estando estes fortemente expressos e confirmando a constante indução do sistema. O ensaio de atividade dos sobrenadantes de cultura destes cultivos mostra aumento da atividade de quitinases, corroborando os resultados obtidos no RT-PCR. Entretanto no

sobrenadante das culturas de 48 horas contendo NacGlc 0,25%, podemos observar uma queda na atividade de quitinases.

Verificamos alta atividade de quitinases nos sobrenadantes dos cultivos com NacGlc 1% como descrito anteriormente, e comparando com os resultados obtidos com o RT-PCR pode-se observar o aumento nos níveis de transcrição dos genes de quitinases. Da mesma forma que ocorreu com NacGlc 0,25% a atividade de quitinase se reduz no tempo de 48 horas de cultivo e neste caso também no tempo de 32 horas. Nos sobrenadantes de cultura nos cultivos na presença de quitina, cutícula de *B. microplus* e de *D. peruvianus*, pudemos observar um aumento na atividade quitinolítica, assim como aumento da expressão dos genes de quitinases, estando nessas condições, o sistema quitinolítico induzido, como esperado. Embora nos cultivos na presença cutícula de *D. peruvianus* haja diminuição da atividade de quitinases a partir de 40 horas de cultivo, não foi observada nenhuma diminuição nos transcritos dos três genes estudados.

Nos cultivos de *M. anisopliae* na presença de glicose e NacGlc, realizamos a reposição do açúcar com intervalos de 16 horas, para manter o sistema induzido ou reprimido, evitando que ocorresse autólise do fungo, caso não houvesse quantidades suficientes de fontes de carbono no meio. Para verificar se ocorreu o consumo destes açúcares, foi realizada a determinação de açúcar redutor, utilizando-se do método do DNS. Nos cultivos com glicose, os altos níveis deste açúcar confirmam que o sistema continua reprimido, já que a glicose é um repressor da síntese quanto à secreção de quitinases (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Essa repressão ocorreu para os transcritos dos genes *chi2* e *chi3*, já que estes estão fracamente expressos durante os cultivos em glicose.

Nos cultivos na presença de NacGlc 0,25% e NacGlc 1% a quantidade de açúcares redutores permanece constante aumentando a partir de 48 horas em NacGlc 0,25%, e a partir de 56 horas em NacGlc 1%. Essa grande quantidade final de açúcares provavelmente ocorre devido às reposições realizadas a cada 16 horas. Além disso, esta grande quantidade de açúcar presente nas amostras leva a crer que havia fonte de carbono suficiente para o desenvolvimento de *M.*

anisopliae, sugerindo que as atividades enzimáticas detectadas durante os ensaios de quitinases, são provenientes das proteínas secretadas e não da autólise do fungo (BARRETO *et al.*, 2004).

O sistema quitinolítico de *M. anisopliae* é regulado por um mecanismo de indução/repressão (ST. LEGER *et al.*, 1998; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004), porém este sistema se mostra cada vez mais complexo. Esta complexidade do sistema de degradação de quitina, anteriormente negligenciada, parece necessária para regular dois processos distintos da biologia do fungo: alterações morfológicas da parede celular do fungo composta por quitina e a utilização de substratos complexos (cutícula) disponíveis no ambiente externo. Neste trabalho verificamos que o tempo e o meio de cultivo interferem significativamente na expressão de genes de quitinases e na secreção e enzimas quitinolíticas.

6. CONCLUSÕES

Transcritos do gene *chit1*, em todos os cultivos realizados, ocorrem desde os tempos iniciais de incubação, tendendo a um aumento, geralmente, a partir de 40 horas de cultivo.

O gene *chi2* apresenta duas espécies de transcritos, os completamente processados e os parcialmente processados. As duas espécies foram observadas durante os cultivos realizados na presença de todas as fontes de carbono. O perfil de transcrição observado para o gene *chi2* mostrou-se variável. Os transcritos apresentam aumento gradativo, nos diferentes tempos e nas diferentes fontes de carbono, com exceção dos cultivos em glicose.

O gene *chi3* também apresenta duas espécies de transcritos, uma completamente processada e outra parcialmente processada. Com exceção dos transcritos provenientes dos cultivos em quitina cristalina, todas as condições apresentam as duas espécies de transcritos para o gene *chi3*. O perfil de transcrição observado para este gene é muito variado, em relação à descontinuidade entre o aumento e diminuição da intensidade dos amplicons obtidos.

Os ensaios de atividade específica de quitinases mostram um maior aumento da atividade quitinolítica nos sobrenadantes de cultura na presença de glicose, somente em 24 horas de cultivo; nos sobrenadantes de cultura na presença de NacGlc 0,25% ou NacGlc 1% principalmente em 40 e 56 horas de cultivo; nos sobrenadantes de cultura na presença de cutícula de *B. microplus* principalmente a partir de 56 horas de cultivo; e nos sobrenadantes de cultura na presença de cutícula de *D. peruvianus* em 48 e 72 horas de cultivo. A atividade de quitinases varia em cada cultivo sendo na maioria das vezes, compatível com os níveis de transcritos observados.

O consumo de açúcares redutores durante os cultivos de *M. anisopliae* em glicose 1%, NacGlc 0,25% e NacGlc 1% variou não sendo o mesmo nas diferentes etapas de cultivo, porém em todos os cultivos a quantidade de açúcares iniciava baixa e terminava alta, devido á adição destes a cada 16 horas.

7. PERSPECTIVAS

Realizar, para cada uma das condições de cultivo aqui estudadas, mais dois cultivos nestas fontes de carbono, com respectivas extrações de RNA e RT-PCR.

Realizar ensaios enzimáticos de atividade de quitinase e determinação de açúcares redutores totais dos novos cultivos que serão realizados.

Géis de atividade com sobrenadantes de cultura para confirmação das quitinases expressas nos cultivos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150: 2029 - 2035, 2004.

ANDERSEN, S. O. Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review of Entomology*, 24: 29 - 61, 1974.

ANGUS, B. M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *Internacional Journal for Parasitology*, 26(12):1341 - 1355, 1996.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENSA, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biological Control*, 31: 172 - 180, 2004.

ARRUDA, W.; LÜBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37: 231 - 244, 2005.

BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S. E.; ST. LEGER, R. J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324: 159 - 169, 2004.

BARATTO, C. M.; SILVA, M. V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 1 - 4, 2003.

BARATTO, C. M. Clonagem, regulação e transformação de genes de quitinases do entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

BARATTO, C. M.; DUTRA, V.; BOLDO, J. T.; LEIRIA, L. B.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current Microbiology*, no prelo.

BARRETO, C. C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology*, 48: 102 - 107, 2004.

BEYS SILVA, W. O.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 40: 321 - 326, 2005.

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

BITTENCOURT, V. R. E. P.; BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K.; SOUZA, E. J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12(1): 38 - 42, 2003.

BITTENCOURT, S. E. T.; DE CASTRO, L. A.; FARIAS, S. E.; BAO, S. N.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Purification and ultrastructural localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. *Research in Microbiology*, 155(8): 681 - 687, 2004.

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

BONFIM, S. M. R. C.; CRUZ, A. H. S.; JESUINO, R. S. A.; ULHOA, C. J.; MOLINARI-MADLUM, E. E. W. I.; SOARES, C. M. A.; PEREIRA, M. Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS: Immunology and Medical Microbiology*, 46: 269 - 283, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry*, 72: 248 - 254, 1976.

BRUCK, D. J.; SNELLING, J. E.; DREVES, A. J.; JARONSKI, S. T. Laboratory bioassays of entomopathogenic fungi for control of *Delia radicum* (L.) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 179 - 183, 2005.

CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiology*, 4(5): 197 - 203, 1996.

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

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25: 1 - 10, 2005.

DEAN, R. A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 211 - 234, 1997.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2): 134 -150, 2000.

DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. 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, 2004.

EKESI, E.; MANIANIA, N. K.; MOHAMED, S. A.; LUX, S. A. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. *Biological Control*, 35: 83 - 91, 2005.

ESTRADA-PEÑA, A.; GARCÍA, Z.; SÁNCHEZ, H. F. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Experimental and Applied Acarology*, 38: 307 - 316, 2006.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution: the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4): 453 - 470, 2000.

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

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

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

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

FREIMOSER, F. M.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. *Microbiology*, 151: 361 - 371, 2005.

HSIAO, Y. M.; KO, J. L. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon*, 39: 837 - 841, 2001.

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

GONÇALVES, L. Biologia e comportamento de *Dysdercus ruficollis* (Linnaeus, 1764) (Hemiptera: Pyrrhocoridae) em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente*, 7(1): 68 - 79, 2000.

GONZALEZ-ACUÑA, D.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of Chile. *Experimental and Applied Acarology*, 35: 147 - 163, 2005.

GREENSTEIN, S.; SHADKCHAN, Y.; JADOUN, J.; SHARON, C.; MARKOVICH, S.; OSHEROV, N. Analysis of the *Aspergillus nidulans* thaumatin-like *cetA* gene and evidence for transcriptional repression of *pyr4* expression in the *cetA*-disrupted strain. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 42 - 53, 2006.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology*, 64: 47 - 64, 1996.

GUTHRIE, J. L.; KHALIF, S.; CASTLE, A. J. An improved method for detection and quantification of chitinase activities. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 491 - 495, 2005.

HUANG, C.-J.; CHEN, C.-I. High-level expression and characterization of two chitinases, ChiCH and ChiCW, of *Bacillus cereus* 28-9 in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327: 8 - 17, 2005.

IKE, M.; NAGAMATSU, K.; SHIOYA, A.; NOGAWA, M.; OGASAWARA, W.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. Purification, characterization and gene cloning of 46 kDa chitinase (*Chi46*) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(3): 294 - 303, 2005.

JACKSON, T. A. Factors in the success and failures of microbial control agents for soil dwelling pests. *International Pest Management Review*, 4: 281 - 285, 1999.

JOSHI, L.; ST LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. *Gene*, 197: 1 - 8, 1997.

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

- KAAYA, G. P.; MUNIYINYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66: 237 - 241, 1995.
- KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *FEMS: Microbiology Letters*, 165: 267 - 271, 1998.
- KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 276 - 281, 1999.
- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74: 213 - 223, 1999.
- KRIEGER DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, 46: 205 - 210, 2003.
- LARRONDO, L. F.; GONZÁLEZ, B.; CULLEN, D.; VICUNÂ, R. Characterization of a multicopper oxidase gene cluster in *Phanerochaete chrysosporium* and evidence of altered splicing of the *mco* transcripts. *Microbiology*, 150: 2775 - 2783, 2004.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JR, I.S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31(1): 01 - 11, 2003.
- LIMON, M. C.; PINTOR-TORO, J. A.; BENITEZ, T. Increased anti-fungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology*, 89: 254 - 261, 1999.

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

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

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*, 27: 194 - 200, 2003.

MANIANIA, N. K.; EKESI, S.; LÖHR, B.; MWANGI, F. Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. *Mycopathologia*, 155: 229 - 235, 2001.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 367 - 386, 1996.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426 - 428, 1959.

MILNER, R. J. Current status of *Metarhizium anisopliae* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol*, 21(2): 47 - 50, 2000.

NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BROETTO, L.; STAATS, C. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1 α* homologous promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1 - 8, 2006.

PAIÃO, J. C. V.; MONTEIRO, A. C.; KRONKA, S. N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 245 - 251, 2001.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 473 - 483, 2000.

PEDRAS, M. S. C.; ZAHARIA, L. I.; WARD, D. E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 59: 579 - 596, 2002.

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

POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.-A.. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160: 151 - 157, 2005.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 217: 959 - 967, 1955.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. Controle biológico de insetos: O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 1(6): 10 - 12, 1998.

SAHAI, A.; MANOCHA, M. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS: Microbiology Reviews*, 11: 317 - 338, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory annual, 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. *Parasitology*, 129: 389 - 403, 2004.

SCHOLTE, E.-J.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*, 2: 1 - 8, 2003.

SCHOLTE, E.-J.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Malaria Journal*, 3(45): 1 - 6, 2004.

SCHOLTE, E.-J.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91: 43 - 49, 2006.

SCREEN, S. E.; BAILEY, A.; CHARNLEY, K.; COOPER, R.; CLARKSON, J. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Current Genetic*, 31: 511 - 518, 1997.

SCREEN, S. E.; BAILEY, A.; CHARNLEY, K.; COOPER, R.; CLARKSON, J. Isolation of a nitrogen response regulator gene (*nrr1*) from *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 221: 17 - 24, 1998.

SCREEN, S. E.; ST. LEGER, R. J. Cloning, expression and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Evidence for lateral gene transfer from an actinomycete bacterium. *Journal Biological Chemistry*, 275: 6689 - 6694, 2000.

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

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal*, 272: 5923 - 5939, 2005.

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

SHARKEY, F. H.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 3795 - 3806, 2004.

SHARMA, S.; ANEJA, M. K.; MAYER, J.; MUNCH, J. C.; SCHLOTTER, M. Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4): 2001 - 2007, 2005.

SHELBURNE, S. A.; MUSSER, J. M. Virulence gene expression in vivo. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 283 - 289, 2004.

SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology*, 56: 382 - 392, 2005.

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

SMITHSON, S. L.; PATERSON, I. C.; BAILEY, A. M.; SCREEN, S. E.; HUNT, B. A.; COBB, B. D.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K.; CLARKSON, J. M. Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 166: 161 - 165, 1995.

ST. LEGER R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes of insect culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 295 - 302, 1986.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, 13: 274 - 288, 1989.

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

ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 299 - 310, 1991b.

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

ST LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 120: 119 - 124, 1992b.

ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 81 - 84, 1993.

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

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the Nacional Academy of Science USA*, 93: 6349 - 6354, 1996b.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2): 709 - 713, 1998.

STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DA-SILVA, C. T.; MULINARI, F. M.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45: 753 - 760, 2005.

TIAGO, P. V.; FUNGARO, M. H.; DE FARIA, M. R.; FURLANETO, M. C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production and virulence. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 335 - 339, 2004.

TULLOCH, H. The genus *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 407 - 411, 1976.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, 137: 2163 - 2169, 1991.

WANG, C.; TYPAS, M. A.; TARIQ, M. B.; BUTT, M. Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS: Microbiology Letters*, 213: 251 - 255, 2002.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *PNAS*, 103(17): 6647 - 6652, 2006.

WEKESA, V. W.; MANIANIA, N. K.; KNAPP, M.; BOGA, H. I. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology*, 36: 41 - 50, 2005.

WHELAN, J. A.; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278: 261 - 269, 2003.