

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

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE QUITINASES DO
ENTOMOPATÓGENO E ACARICIDA *METARHIZIUM ANISOPLIAE***

Tese de Doutorado

César Milton Baratto

Porto Alegre, 2005

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

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE QUITINASES DO
ENTOMOPATÓGENO E ACARICIDA *METARHIZIUM ANISOPLIAE***

César Milton Baratto

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Marilene H. Vainstein

Porto Alegre, 2005

Este trabalho foi inteiramente realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul / Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi financiado com recursos do CNPq, FAPERGS e PADCTIII. Uma bolsa de Doutorado foi concedida pela CAPES para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^a Dr. Augusto Schrank e à Prof^a Dr^a. Marilene H. Vainstein, pela orientação e co-orientação.

À comissão de acompanhamento, Prof^a Dr^a. Irene Schrank e o Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

A relator da tese, Prof. Dr. Arnaldo Zaha.

Aos colegas do Laboratório 205 e 213.

Aos amigos e demais colegas do Centro de Biotecnologia.

À diretoria, coordenação e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do CBiot/UFRGS.

Em especial aos meus pais, Josino e Avelina, meus irmãos, Marcos, Augusto e Sandra e minhas sobrinhas Djuli, Natália e Fernanda.

À Liliane pelo apoio incondicional e pela compreensão da minha constante ausência.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	X
Lista de figuras	XII
Lista de tabelas	XIV
Resumo	XV
Abstract	XVII
1. Introdução	01
2. Revisão bibliográfica	03
2.1 - <i>M. anisopliae</i> como biocontrolador de insetos e carrapatos	03
2.2 - Taxonomia do gênero <i>Metarhizium</i>	05
2.3 - O fungo entomopatogênico e acaricida <i>M. anisopliae</i> e o processo de infecção	06
2.4 - Fatores de virulência de <i>M. anisopliae</i>	08
2.5 - Quitinas e quitinases	14
2.6 - Quitinases purificadas de <i>M. anisopliae</i>	17
2.7 - Genes de quitinases isolados de <i>M. anisopliae</i>	18
2.8 - Função e regulação de quitinases em fungos filamentosos	20
2.9 - Prováveis seqüências reguladoras do gene <i>chit1</i> e de outros genes de quitinases	24
2.10 Objetivos	29
2.10.1 Objetivo Geral	29
2.10.2 Objetivos Específicos	29
3. Material e Métodos	30
3.1 Organismos, plasmídeos, bancos de DNA e oligonucleotídeos	30
3.1.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	30
3.1.2 Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
3.1.2.1 Suspensão de esporos e manutenção <i>M. anisopliae</i>	31
3.1.3 Plasmídeos.....	31
3.1.4 Bancos de DNA.....	31

3.1.5 Oligonucleotídeos.....	31
3.2 Meios de cultura.....	32
3.2.1 Meios de cultura para <i>E. coli</i>	32
3.2.1.1 Meio de LB (Luria-Bertani).....	32
3.2.1.2 Meio SOC.....	32
3.2.2 Meios de cultura para <i>M. anisopliae</i>	32
3.2.2.1 Meio de Cove (MC).....	32
3.2.2.2 Meio de Cove Completo (MCc).....	33
3.2.2.3 Meio Mínimo (MM).....	33
3.3 Cultivo dos microrganismos.....	33
3.3.1 Cultivo de <i>E.coli</i> em meio líquido.....	33
3.3.2 Cultivo de <i>M. anisopliae</i> em meio líquido.....	33
3.3.2.1 Cultivo de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono.....	33
3.3.2.2 Preparação de cutícula de <i>B. microplus</i>	34
3.4 Enzimas e antibióticos.....	34
3.4.1 Enzimas.....	34
3.4.1.2 RNase A.....	34
3.4.1.2 DNase A.....	34
3.4.2 Antibióticos e antifúngicos.....	34
3.4.2.1 Ampicilina.....	34
3.4.2.2 Glifosinato de Amônio (GA).....	35
3.5 Manipulação de DNA.....	35
3.5.1 Extração de plasmídeos.....	35
3.5.1.1 Minipreparação - Lise alcalina.....	35
3.5.1.2 Extração de plasmídeos em grande escala.....	35
3.5.2 Extração de DNA genômico de <i>Metarhizium anisopliae</i>	35
3.5.3 Extração de RNA de <i>M. anisopliae</i>	36
3.5.4 Clivagem e análise de DNA por eletroforese.....	37
3.5.4.1 Clivagem de DNA com endonucleases de restrição.....	37
3.5.4.2 Eletroforese de DNA ou RNA em gel de agarose.....	37
3.5.5 Purificação e ligação de DNA.....	37
3.5.5.1 Purificação de fragmentos de DNA de géis de agarose.....	37
3.5.5.2 Ligação de DNA.....	38

3.5.6	Transferência de DNA para membrana de náilon.....	38
3.5.6.1	Transferência de DNA para análise por <i>Southern</i>	38
3.5.6.2	Transferência de DNA de colônias de <i>E. coli</i> para hibridização.....	38
3.5.7	Hibridizações de DNA genômico (<i>Southern</i>) e de colônias.....	38
3.5.7.1	Detecção de hibridização por método não radioativo.....	38
3.5.7.2	Detecção de hibridização por método radioativo.....	38
3.5.8	Construção do banco subgenômico de <i>M. anisopliae</i>	39
3.5.9	Amplificação de DNA (PCR; <i>polymerase chain reaction</i>).....	39
3.5.9.1	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #Chit1F e #Chit1R (Tabela 6).....	39
3.5.9.2	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #Chi2F e #Chi2R (Tabela 6).....	40
3.5.9.3	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tef1F e #tef1R (Tabela 6).....	40
3.5.9.4	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #xGFP e # PUC/M13F (Tabela 6).....	40
3.5.9.5	Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #xGFP e # panR (Tabela 6).....	40
3.5.10	Amplificação por RT-PCR (<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>).....	40
3.5.11	Técnica de PCR RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>).....	41
3.5.12	Seqüenciamento de DNA.....	41
3.5.13	Comparação e análise das seqüências de nucleotídeo e aminoácidos....	41
3.6	Transformação de <i>E. coli</i> e <i>M. anisopliae</i>	42
3.6.1	Eletroporação de bactérias.....	42
3.6.2	Protoplastização.....	42
3.6.3	Transformação de <i>M. anisopliae</i>	42
3.7	Análise de expressão de quitinase ou de GFP nos transformantes	43
3.7.1	Expressão de GFP pelos transformantes de <i>M. anisopliae</i> para análise de promotor.....	43
3.7.2	Ensaio enzimático para detecção de quitinase	43
3.8	Soluções e tampões	44
3.8.1	Solução para suspensão de esporos e cultivos de <i>M. anisopliae</i>	44

3.8.2 Soluções para extração de plasmídeos (minipreparação).....	44
3.8.3 Soluções e tampões para extração de ácidos nucléicos de <i>M. anisopliae</i>	45
3.8.4 Soluções e tampões para análise de ácidos nucléicos.....	46
3.8.5 Tampões e soluções para transferência de DNA, segundo o manual de instruções do kit ECL (Amersham Biosciences).....	46
3.8.6 Tampões e soluções para hibridização não radiativa, segundo o manual de instruções do kit ECL (Amersham Biosciences).....	47
3.8.7 Tampões e soluções para a hibridização radioativa (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).....	47
3.8.8 Tampões e soluções para transformação de <i>M. anisopliae</i>	48
3.8.9 Tampões e soluções para ensaios enzimáticos.....	49
4. Resultados.....	50
4.1 Isolamento e caracterização do gene <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i> isolado E₆.....	50
4.2 Análise do padrão de expressão dos genes <i>chit1</i> e <i>chi2</i> em condições vegetativas e de infecção de <i>M. anisopliae</i>.....	69
4.3 Análise das seqüências regulatórias do gene <i>chit1</i>.....	73
4.3.1 Construções da região flanqueadora 5' do gene <i>chit1</i> com a proteína repórter GFP.....	73
4.3.2 Transformação de <i>M. anisopliae</i> E ₆ com as construções para análise do promotor do gene <i>chit1</i> de <i>M. anisopliae</i>	79
4.4 Superexpressão do gene <i>chit1</i> em <i>M. anisopliae</i>.....	83
4.4.1 Obtenção de construções para a superexpressão do gene <i>chit1</i>	83
4.4.2 Transformação de <i>M. anisopliae</i> E ₆ com as construções para superexpressão do gene <i>chit1</i> de <i>M. anisopliae</i>	86
4.4.3 Análise da secreção de quitinase dos transformantes contendo a construção para a superexpressão do gene <i>chit1</i>	91
5. Discussão.....	93
6. Conclusões.....	107

7. Perspectivas.....	108
8. Referências Bibliográficas.....	109
9. Anexo.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Ácido adenílico
A ₂₈₀	Absorbância em comprimento de onda igual a 280 nanômetros
Ap ^R	Resistente a ampicilina
ARE	Fator GATA envolvido na regulação de genes da via do metabolismo de nitrogênio em <i>A. nidulans</i>
ATCC	American Type Culture Collection
<i>bar</i>	Gene de Fosfinotricina acetiltransferase de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
ben ^R	Resistente ao benomil
BSA	Albumina sérica bovina
C	Ácido citidílico
CBD	Domínio de ligação a celulose
cDNA	Seqüência de DNA complementar
cm	Centímetro
CREA	Proteína reguladora envolvida na repressão catabólica de carbono
Cys	Cisteína
DMAB	ρ-dimetilaminobenzaldeído
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo (s) trifosfato (s)
dsRNA	Ácido ribonucléico dupla fita
DTX	Destruxina
EDTA	Ácido etilodiaminotetracético, sal sódico
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
g	Grama, aceleração da gravidade
G	Ácido guanidílico
GA	Glifosinato de amônio
<i>Gpd</i>	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GenBank	Banco de seqüência gênica
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
h	Hora
H	Base pirimídica
ha	Hectare
HSP	Proteína de choque térmico
IPTG	Isopropionil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodaltons = 1.000 daltons
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampere
MC	Meio de Cove
MCC	Meio de Cove completo
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
NAcGlc	<i>N</i> -acetilglicosamina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NIT2	Fator GATA homólogo a AREA em <i>N. crassa</i>
NIT4	Fator GATA homólogo a AREA em <i>N. crassa</i>
NIRA	Fator GATA envolvido na regulação de genes da via do metabolismo de nitrogênio em <i>A. nidulans</i> .
nt	Nucleotídeos
nm	Nanômetro
OD _{260/280}	Densidade ótica em absorbância em comprimento de onda igual a 260 / 280 nanômetros
ON	Over night (14-16 h)
ORF	Fase de leitura aberta
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
<i>Pgpd</i>	Promotor do gene Gliceraldeído-3-fosfato-de-desidrogenase de <i>A. nidulans</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
p/p	Peso por peso
PTN	Proteínas
p/v	Peso por volume
RDA	Análise representativa de diferenças na expressão
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RNA poli A ⁺	RNA poliadenilado
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da DNA-polimerase por transcrição reversa
S	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
T	Ácido timidílico
sGFP	<i>green fluorescent protein</i> utilizada para expressão em plantas
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Triton X-100	Éter octilfenólico de decaetilenoglicol
<i>trpC</i>	Triptofano C
<i>TtrpC</i>	Terminador do gene de Triptofano C de <i>A. nidulans</i>
Tween	Polisorbitano
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Radiação ultravioleta
V	Volts
V/h	Volts por hora
v/v	Volume por volume
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esquema demonstrando a estrutura e a constituição da cutícula de insetos.....	07
Figura 2	– Ciclo de vida do fungo <i>M. anisopliae</i> no carrapato <i>B. microplus</i>	09
Figura 3	– Possível mecanismo de penetração do fungo <i>M. anisopliae</i> em <i>B. microplus</i>	09
Figura 4	– Estrutura covalente da quitina.....	14
Figura 5	– Representação esquemática do tipo de ação das quitinases.....	16
Figura 6	– Mecanismo de regulação de quitinases.....	23
Figura 7	– Região flanqueadora 5' do gene <i>chit1</i> e os prováveis elementos envolvidos na sua regulação.....	26
Figura 8	– Comparação entre a seqüência do amplicon correspondente ao gene <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> com a seqüência correspondente da var. <i>acridum</i> (AJ293217).....	51
Figura 9	– Análise do gene <i>chi2</i> no genoma de <i>M. anisopliae</i> linhagem E ₆	52
Figura 10	– Representação esquemática do gene <i>chi2</i>	53
Figura 11	– Determinação do sítio de início da transcrição do gene <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i> E ₆	55
Figura 12	– Seqüência do gene <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> linhagem E ₆	59
Figura 13	– Comparação entre as proteínas deduzidas a partir do gene <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e var. <i>acridum</i>	61
Figura 14	– Comparação entre as seqüências de aminoácidos da quitinase CHI2 de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> linhagem E ₆ com outras quitinases de fungos depositadas no Genbank.....	62
Figura 15	– Árvore filogenética <i>Neighbor-joining</i> formada pela comparação entre quitinases de fungos.....	65
Figura 16	– Região flanqueadora 5' do gene <i>chi2</i> e os prováveis elementos envolvidos na sua regulação.....	67
Figura 17	– Comparação entre as regiões regulatórias de genes de quitinases de fungos.....	68
Figura 18	– Nível de transcritos dos genes <i>chit1</i> e <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i>	70

Figura 19 – Mapa físico dos plasmídeos pANsGFP (FERNÁNDEZ-ÁBALOS <i>et al.</i> , 1998) e pANBAR.....	76
Figura 20 – Construções com a região flanqueadora 5' do gene <i>chit1</i> e a proteína repórter sGFP para localização de elementos regulatórios.....	77
Figura 21 – Análise de transformantes resistentes ao glifosinato de amônia quanto à presença do gene repórter <i>sgfp</i>	80
Figura 22 – Análise dos transformantes por hibridização.....	81
Figura 23 – Mapa físico do plasmídeo pTEFCHIT1B.....	85
Figura 24 – Clonagem do gene <i>chit1</i> no vetor pTEFBAR.....	86
Figura 25 – Análise de transformantes resistentes ao glifosinato quanto à presença do cDNA do gene <i>chit1</i>	88
Figura 26 – Análise por hibridização dos transformantes de <i>M. anisopliae</i> para superexpressão do gene <i>chit1</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Utilização de <i>M. anisopliae</i> como biocontrolador.....	04
Tabela 2	– Quitinases e genes de quitinases isolados de <i>M. anisopliae</i> e suas principais propriedades.....	19
Tabela 3	– Linhagens bacterianas utilizadas e seus genótipos.....	29
Tabela 4	– Plasmídeos utilizados.....	31
Tabela 5	– Oligonucleotídeos utilizados.....	32
Tabela 6	– Componentes das reações de amplificação de DNA por PCR.....	39
Tabela 7	– Quitinases de fungos com identidade com a quitinase CHI2 de <i>M. anisopliae</i> linhagem E ₆	58
Tabela 8	– Regulação dos genes de quitinases <i>chit1</i> e <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i>	72
Tabela 9	– Resumo dos resultados obtidos com a transformação de <i>M. anisopliae</i> para análise de promotor.....	80
Tabela 10	– Resumo dos resultados das transformações das construções para superexpressão do gene <i>chit1</i> para <i>M. anisopliae</i>	88
Tabela 11	– Atividade de quitinase dos transformantes superexpressando o gene <i>chit1</i> ou contendo o gene <i>chit1</i> antisense.....	92

RESUMO

O fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae* é patógeno de uma vasta gama de insetos, sendo extensivamente utilizado em experimentos, bem como, no controle efetivo de alguns insetos-praga. Seu potencial uso para o controle de carrapatos como *Boophilus microplus* é também considerável. O processo de infecção de *M. anisopliae* é o melhor caracterizado entre os fungos entomopatogênicos, e combina pressão mecânica, por diferenciação do apressório, síntese e secreção de enzimas hidrolíticas altamente reguladas como proteases e, provavelmente, quitinases e lipases. As quitinases em fungos também são importantes em processos que requerem digestão celular, como germinação, crescimento e ramificação das hifas e autólise, visto que a quitina é o maior constituinte da parede celular desses organismos, sendo um sistema altamente regulado. Objetivamos neste trabalho, obter mais informações sobre o sistema quitinolítico do fungo *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆ durante o processo de infecção do hospedeiro ou na morfogênese e crescimento.

Com o objetivo de analisarmos o gene *chi2* de *M. anisopliae* E₆, clonamos e caracterizamos sua seqüência genômica, incluindo a região flanqueadora 5'. O gene *chi2* é interrompido por dois pequenos *íntrons* típicos, de 210 pb e 75 pb, respectivamente. A ORF do gene *chi2* apresenta 1.545 pb e codifica uma proteína predita de 419 aminoácidos (denominada CHI2), com massa molecular estimada de 44 kDa. Um peptídeo sinal característico com sítio de clivagem no aminoácido V¹⁹ está presente. A forma madura dessa proteína tem uma massa molecular estimada de 42 kDa e um *pI* teórico de 4,8. Análise por *Southern* de DNA genômico indica cópia única de *chi2* no genoma de *M. anisopliae*. A seqüência de consenso SXGG, correspondendo ao sítio de ligação à quitina, foi identificada e a seqüência NGFDFDIE, que compõem o domínio catalítico de quitinases, está presente em CHI2. A construção de uma árvore filogenética determinou que a quitinase CHI2 pertence a um grupo diferente daquele da CHIT42 a qual provavelmente não está envolvida na patogenicidade. Uma análise *in silico* da seqüência 5' franqueadora do gene *chi2* para determinação de possíveis elementos regulatórios foi efetuada.

A regulação da transcrição dos genes *chit1* e *chi2* em *M. anisopliae* frente a diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos de cultivo foi analisada. Os genes *chit1* e *chi2* apresentaram uma expressão tardia no fungo, a partir de 30 horas. O gene *chi2* foi expresso majoritariamente em cultivos com quitina e sua expressão foi reprimida por glicose. O gene *chit1* foi induzido em presença de fontes de carbono facilmente assimiláveis, como glicose e NAcGlc. Ambos os genes, *chit1* e *chi2*, apresentaram alta expressão quando a fonte

de carbono já estava exaurida e o fungo estava em autólise, sugerindo o requerimento dessas enzimas nessa fase.

O cDNA do *chit1* foi inserido em um vetor de expressão, em ambas orientações senso e antisenso, sob regulação do promotor do gene *tef1 α* de *M. anisopliae* e o terminador do gene *trpC* de *A. nidulans*. Os transformantes com o gene *chit1* na orientação senso mostraram superexpressão de atividade de quitinase e o transformante com o gene na orientação antisenso apresentou uma redução na atividade de quitinase.

Também construímos quatro deleções na região flanqueadora 5' do gene *chit1* fusionadas com a proteína repórter SGFP, para localizar seqüências reguladoras no promotor e, destas construções, três foram transformadas em *M. anisopliae*.

ABSTRACT

The entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae* is a well-known, broad-host-range insect pathogen that is being extensively used in experimental as well as in effective control of several insect pests. Its potential use to control ticks, as *Boophilus microplus*, have been envisaged. Its host infection process is the best characterized among entomopathogenic fungi and combines mechanical pressure, via the apressorium differentiation, and the highly regulated synthesis and secretion of hydrolytic enzymes such as proteases and probably chitinases and lipases. Fungal chitinases also play an important role in processes requiring cell wall digestion, such as germination, growth and branching hyphae and autolysis, since chitin is a major constituent of their cell wall, and are highly regulated. We aim to obtain more information of chitinolytic system of fungus *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E₆ during the host infection process or in morphogenesis and growth.

In order to analyze the *chi2* gene from *M. anisopliae* E₆, we cloned and characterized its genomic sequence, including its 5' flanking region. The *chi2* gene is interrupted by two short typical fungal introns with 210 and 75 bp, respectively. The *chi2* gene codes for a 1,545-bp ORF, which encodes for a predicted protein of 419 amino acids (named CHI2), with 44 kDa molecular mass. A characteristic signal peptide with putative cleavage site in V¹⁹ is present. The predicted mature protein has 42-kDa and a theoretical pI of 4.8. Southern analysis of genomic DNA indicates a single copy of *chi2* in the *M. anisopliae* genome. The consensus motif SXGG corresponding to a chitin-binding site was identified and the sequence NGFDFDIE found at the chitinases catalytic domain are present in CHI2. The construction of phylogenetic tree grouped CHI2 chitinase in a different cluster from CHIT42, which probably is not involved in pathogenicity. The *in silico* analysis of the 5' flanking region *chi2* gene for determinate of possible regulator elements was effected.

The transcription regulation of *chit1* and *ch2* genes in different carbon sources and different culture times was analyzed. The *chit1* and *chi2* genes were upregulated on late cultures, after 30 hours. The *chi2* gene was mainly expressed in presence of chitin and was repressed on glucose. The *chit1* gene was induced on easier assimilated carbon sources as glucose and GlcNAc. Both genes, *chit1* and *chi2* were highly expressed when the carbon source has exhausted and the fungus enters autolysis, suggesting chitinase requirement in this step.

The *chit1* cDNA, was inserted in expression vectors, both sense and antisense orientation, under the control of the *M. anisopliae* *tef1 α* promoter and the *A. nidulans* *trpC*

terminator. Transformants with the sense orientation of *chit1* gene showed over-expression of chitinase activity and transformant with the antisense orientation showed reduced chitinase activity.

We also constructed four deletions in the *chit1* gene 5' flanking region fused to the reporter protein SGFP to locate regulatory promoter sequences, and this constructions, tree are transformed in *M. anisopliae*.

1 – INTRODUÇÃO

É notório o conflito existente entre as atividades de cunho econômico, como a agropecuária, e a preservação do meio ambiente. Ao mesmo tempo, a sociedade tem exigido uma atividade agrícola equilibrada com a preservação ambiental e dos ecossistemas e sua compatibilidade com a produtividade, que permita satisfazer as necessidades das gerações atuais e futuras.

A necessidade de corresponder às demandas da sociedade por produção de alimentos, desenvolvimento econômico e geração de emprego e renda, sem agressão à natureza e com sustentabilidade, é um grande desafio a todos nós. Para atingir este objetivo, deve-se buscar componentes de preservação ambiental, visando à conservação de recursos naturais, como a biodiversidade, a água, o solo e o ar, e objetivando melhor qualidade de vida, produção de alimentos saudáveis e, ao mesmo tempo, propiciar a prosperidade do setor de produção. Uma das implementações tecnológicas na agropecuária que visa à harmonização da atividade produtiva e os princípios de equilíbrio e de sustentabilidade é o controle biológico.

O controle biológico é baseado em uma idéia simples, controlar pragas usando seus próprios inimigos naturais. Ele tem função precípua no arranjo natural, preservando o equilíbrio ecológico, representando uma evolução da agricultura brasileira e mundial. Esse sistema de controle de pragas evita o uso de milhões de litros de defensivos agrícolas por ano, cujos resíduos poderiam se acumular no solo, na água ou nos alimentos, pois seu uso de forma irracional e não-orientado traz riscos ao meio ambiente e à saúde humana.

Existe uma demanda crescente para métodos alternativos ao controle químico de pragas na produção agropecuária. Os pesticidas, inseticidas e agrotóxicos causam uma série de efeitos deletérios ao ambiente e a saúde humana e animal. O Brasil ocupa o quarto lugar no consumo de defensivos agrícolas no mundo e os gastos atuais correspondentes são estimados em mais de R\$ 5,5 bilhões por ano (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2002).

Entre os organismos utilizados no controle biológico, os fungos filamentosos se destacam por seu grande potencial. Destes, um dos mais importantes biocontroladores é o fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae*, que além do seu uso no controle biológico, apresenta uma vasta diversidade e tem servido de forma bastante significativa como modelo de organismo eucariótico para o estudo dos mecanismos de patogenicidade (MELO & AZEVEDO, 1998).

Diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* infectam e matam uma variedade de insetos praga na agricultura e carrapatos prejudiciais à bovinocultura. Estas características têm sido utilizadas para o controle biológico na agricultura e com grandes perspectivas para a pecuária. O entendimento dos mecanismos básicos do processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros tem permitido a proposição de alterações que tornam o sistema mais eficiente. A etapa de penetração é crítica no processo de infecção. A penetração é direta, através do exoesqueleto do hospedeiro (cutícula), e depende de pressão mecânica, exercida pelo apressório formado, e da secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e lipases. Quitinases, assim como outras hidrolases, além do envolvimento potencial na invasão de hospedeiros, estão relacionadas aos processos de morfogênese em fungos (GOODAY *et al.*, 1992; TAKAYA *et al.*, 1997). Em *M. anisopliae*, oito quitinases foram purificadas e caracterizadas e dois diferentes genes de quitinases (genes *chit1* e *chi3*; BOGO *et al.*, 1998; FREIMOSER *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005) foram clonados e outro gene teve sua seqüência parcial determinada (gene *chi2*; FREIMOSER *et al.*, 2003).

Nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos, Centro de Biotecnologia da UFRGS), tem se dedicado à caracterização do sistema de degradação de quitina em *M. anisopliae*, tendo caracterizado três bandas de atividades de quitinases em sobrenadantes de culturas (PINTO *et al.*, 1997). Uma dessas quitinases foi purificada (CHIT30, codificada pelo gene *chi3*; PINTO *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2005), com 30 kDa que apresenta ambas atividades de endo e exoquitinase, cuja presença foi demonstrada durante o processo de infecção de carrapato. Foi ainda, clonado outro gene para quitinase (gene *chit1*; BOGO *et al.*, 1998), que apresenta alta identidade com outras quitinases de bactérias e de fungos, tendo sido expresso em *E. coli*, demonstrando codificar uma quitinase de 42 kDa (CHIT42) que apresenta atividade de endoquitinase (BARATTO *et al.*, 2003).

O presente trabalho relata resultados que auxiliam para o futuro esclarecimento sobre a possível participação de quitinases de *M. anisopliae* E₆ durante a infecção de hospedeiros ou em processos fisiológicos, como a morfogênese, destacando-se: a clonagem e a caracterização do gene *chi2* da linhagem E₆ de *M. anisopliae*; a análise do seu nível de transcrição juntamente com o do gene *chit1*, em cultivos com diferentes fontes de carbono; a superexpressão da quitinase, codificada pelo gene *chit1*, em *M. anisopliae* E₆ e a análise de alterações na expressão de quitinases nesses transformantes. Relata, ainda, a obtenção de construções com a região flanqueadora 5' do gene *chit1* e o gene repórter *sgfp* e a sua transformação em *M. anisopliae* E₆, para análise de possíveis elementos regulatórios desta região.

2 - Revisão bibliográfica

2.1 - *M. anisopliae* como biocontrolador de insetos e carrapatos

O controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas de plantas e vantajoso em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, custo, especificidade e desenvolvimento de resistência. Entre os microrganismos, incluindo os vírus, com aplicação potencial no controle biológico de insetos, destacam-se os fungos filamentosos. A grande variabilidade genética destes entomopatógenos pode ser considerada uma das principais vantagens. Mais de 700 espécies de fungos pertencentes a aproximadamente 90 gêneros são agentes etiológicos de 80% das doenças de insetos (ALVES, 1998).

Entretanto, os bioinseticidas tradicionais apresentam normalmente um desempenho menor em relação à velocidade de letalidade de insetos alvo, quando comparados com o controle químico. Esforços têm sido realizados no sentido de melhorar a produção, a estabilidade e a aplicação de inóculos destes fungos. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o hospedeiro tem permitido o melhor conhecimento da natureza da patogenicidade e de suas características. Esse entendimento alia-se a uma nova abordagem que apresenta um enorme potencial: a introdução de genes específicos, altamente expressos em condições de infectividade, visando acelerar o processo de infecção (ST. LEGER *et al.*, 1996 a).

Estima-se que *M. anisopliae* infecte mais de 300 espécies de insetos. Linhagens de *M. anisopliae* têm sido utilizadas com sucesso na agricultura em vários países para o controle biológico (Tabela 1): de gafanhotos (*Schistocerca pallens*, *S. gregaria*.; NOWIERSKI *et al.*, 1996; KASSA *et al.*, 2004), de besouros (*Hoplia philantjuss*; ANSARI *et al.*, 2004), de larvas de lepidópteros (*Chilo partellus*; TAFERA & PRINGLE, 2003) e, no Brasil, como controlador da cigarrinha de cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), da cigarrinha-das-pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), da broca-da-cana (*Diatrea saccharalis*), de percevejos-da-soja dos gêneros *Nezara* e *Piezodorus*, de *Cosmopolites sordidus*, em bananeira, do bicudo-do-algodoeiro e da broca-do-café (ALVES, 1998). Em trabalhos experimentais, o fungo foi testado com sucesso sobre larvas de *Lucilia sericata* (WRIGHT *et al.*, 2004), *Musca domestica* (ALVES, 1998), ectoparasitos de abelhas *Varroa destructor* (KANGA *et al.*, 2003), dentre outros insetos praga (DIMBI *et al.*, 2003; SCHOLT *et al.*, 2003; QUESADA-MORAGA *et al.*, 2004). *M. anisopliae* é ainda capaz de infectar

carrapatos, como *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes scapularis* e *Boophilus microplus* (ZHIOUA *et al.*, 1997; CORREIA *et al.*, 1998; FRAZZON *et al.*, 2000; KIRKLAND *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Utilização de *M. anisopliae* como biocontrolador.

Praga	Nome vulgar	Aplicação
<i>Mahanarva fimbriolata</i> <i>Mahanarva Postigata</i>	Cigarrinha-da-cana	Agricultura
<i>Deois flavopicta</i> <i>Zulia enterrana</i>	Cigarrinha/Pastagens	Agricultura
<i>Diploschema rotundicollee</i> <i>Hypothenemus hampei</i>	Broca do café	Agricultura
<i>Schistocerca pallens</i>	Gafanhoto	Agricultura
<i>Boophilus microplus</i> <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Carrapato	Pecuária
<i>Panstrongylus megistis</i>	Barbeiro	Saúde
<i>Triatoma infestans</i>	Barbeiro	Saúde
<i>Blatella germanica</i>	Barata	Saúde
<i>Musca Domestica</i>	Mosca	Saúde
<i>Glossina ssp.</i>	Moscas tsé-tsé	Saúde
<i>Anopheles gambiae</i>	Malária	Saúde
<i>Cornitermes cumulans</i>	Cupins	Agricultura
<i>Cornitermes bequerti</i>		Madeiraira

O fungo entomopatogênico e acaricida *M. anisopliae* é um dos melhores exemplos de utilização de um organismo em controle biológico, pois apresenta eficiência comprovada e comercialização, para o controle de pragas de cana-de-açúcar e pastagens, fazendo parte do programa mais conhecido no Brasil e no mundo para o controle da cigarrinha no Nordeste brasileiro (ALVES, 1990). Seus primeiros resultados positivos surgiram em 1965 e, a partir daí, houve a instalação de laboratórios na região para viabilizar a sua utilização no controle biológico (MARQUES *et al.*, 1981). *M. anisopliae* apresenta uma estimativa de controle de até 60% da cigarrinha, que é considerada alta, visto que estas causam grandes prejuízos,

comprometendo a obtenção dos subprodutos da cana-de-açúcar, o álcool e o açúcar. A sua utilização tem aumentado significativamente, atingindo milhares de hectares. Sua maior eficiência ocorre em áreas com aplicações aéreas, nas quais, depois de decorridos 15 a 20 dias das aplicações, a mortalidade de ninfas e adultos foi superior a 80% (FONTES, 1992; ALVES, 1998). Tal sucesso possibilitou a diminuição da área com uso de produtos químicos, que inicialmente era de 150.000 ha/ano para 12.000 ha/ano, ou seja, uma redução de quase 90% (MELO & AZEVEDO, 1998). Havendo, ainda, perspectivas para sua utilização em nível comercial em outros países (FERNANDEZ, 2000).

2.2 – Taxonomia do gênero *Metarhizium*

O fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae* é provavelmente um ascomiceto (LIU *et al.*, 2001) pertencente à classe Hiphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliacea. Foi descrito pela primeira vez por Metschnikoff na Rússia em 1878, parasitando larvas de bezouro-de-grãos, *Anisopliae austriaca*. Sua descrição foi revisada por TULLOCH (1976) e o gênero passou a compreender duas espécies, *Metarhizium anisopliae* (var. *minor* e *major*) e *Metarhizium flavoviridae*. Recentemente, sua taxonomia foi revista e foram reconhecidas três espécies para o gênero *Metarhizium* e estas, subdivididas em 9 variedades: *Metarhizium anisopliae* (var. *anisopliae*, var. *majus*, var. *lepidiotum* e var. *acridum*); *Metarhizium flavoviride* (var. *flavoviride*, var. *minus*, var. *novazealandicum* e var. *pemphigum*) e *Metarhizium album* (DRIVER *et al.*, 2000).

Inicialmente, eram conhecidas duas formas de reprodução anamórficas de *M. anisopliae*: a reprodução assexuada, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexuada, que envolve os fenômenos de heterocariose e de recombinação mitótica, o que levava, *M. anisopliae* a ser classificado como deuteromiceto (TULLOCH, 1976). No entanto, em estudos recentes, foi possível induzir a sua forma sexuada em um isolado de *M. anisopliae* var. *majus*, sendo seu telemórfico, denominado *Cordyceps brittlebankisoides*, atualmente é considerado um ascomiceto (LIU *et al.*, 2001).

2.3 - O fungo entomopatogênico e acaricida *M. anisopliae* e o processo de infecção

Os fungos entomopatogênicos invadem seus hospedeiros por penetração direta dos exoesqueletos ou cutículas (ST. LEGER *et al.*, 1991a; CLARKSON & CHARNELEY, 1996). O processo de infecção em insetos, mediado por *M. anisopliae*, ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (SCHRANK *et al.*, 1993; ALVES, 1998). O processo é iniciado pela germinação dos esporos sobre a cutícula do inseto. Na superfície do esporo, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas que têm efeito na aquisição preliminar de nutrientes e que também causam modificações nas camadas mais externas da cutícula do inseto (ST. LEGER *et al.*, 1990). Em seqüência, o esporo germina e o tubo germinativo, na sua porção distal, se diferencia para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, cuja a formação é estimulada pelo contato físico com a cutícula do inseto (ST. LEGER *et al.*, 1991a). Esse estímulo também se dá, pela sensível alteração da superfície, indicando um possível mecanismo, pelo qual, o patógeno reconhece seu hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1990).

Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento da estrutura conhecida como grampo de penetração (ST. LEGER *et al.*, 1991a). Evidências obtidas por análise de microscopia eletrônica e histoquímica sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica (ST. LEGER *et al.*, 1988). Nesse processo, são produzidas algumas enzimas, como lipases, quitinases e proteases (ST. LEGER *et al.*, 1986a; b; 1988, 1991a; b; PINTO *et al.*, 1997; ALVES, 1998; BEYS SILVA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

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

Inicia-se, então, o processo de colonização do hospedeiro. As hifas que penetram sofrem um espessamento e se ramificam inicialmente no tegumento do inseto e, posteriormente, na cavidade geral do corpo, liberando toxinas e ocasionando sua morte. A função das toxinas sintetizadas nesta etapa não está ainda completamente entendida. Provavelmente seus efeitos são de imobilizar ou matar o inseto, auxiliando o fungo na

colonização completa do hospedeiro após a penetração (ST. LEGER *et al.*, 1991a; HSIAO *et al.*, 2001).

Após a morte do inseto, as hifas se desenvolvem invadindo os diversos órgãos internos e o micélio emerge do corpo do inseto, produzindo esporos que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos. A grande variabilidade genética apresentada por *M. anisopliae*, resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz ultravioleta (ALVES, 1998). A entomopatogenicidade de *M. anisopliae* é dependente de um relacionamento complexo entre as habilidades do fungo para germinar e penetrar na cutícula e a habilidade do inseto em evitar a infecção pelo fungo. Linhagens patogênicas de *Metarhizium* para uma espécie particular de hospedeiro, podem não apresentar as mesmas características de patogenicidade para outras espécies de insetos (HUXHAM *et al.*, 1989).

O tegumento dos insetos é composto por três camadas principais: a cutícula externa, a camada celular, ou epiderme, e a membrana basal. A cutícula dos insetos constitui-se na maior barreira contra o ataque e a penetração de microrganismos (ST. LEGER *et al.*, 1986a; ST. LEGER *et al.*, 1986b; ST. LEGER *et al.*, 1991a; Figura 1), sendo composta por duas camadas, a epicutícula e a procutícula. A primeira é a mais externa e mais complexa, sendo composta por proteínas, lipídios, ácidos graxos e esteróides. A segunda possui fibras de quitina embebidas em uma matriz protéica associada a lipídeos e quinonas (ANDERSEN, 1974). Tal estrutura complexa permite concluir que a penetração e a infecção do fungo se devem à ação de várias classes de enzimas (ST. LEGER *et al.*, 1986a; ST. LEGER *et al.*, 1991b; ST. LEGER *et al.*, 1996b; PINTO *et al.*, 1997).

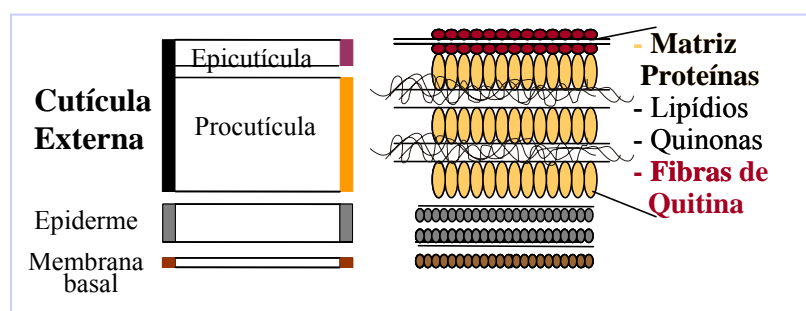


Figura 1 – Esquema demonstrando a estrutura e a constituição da cutícula de insetos. Modificado de BIDOCHKA *et al.* (1997) e MERZENDORFER & ZIMOCH (2003).

A dinâmica da infecção de *B. microplus* por *M. anisopliae* foi avaliada em condições experimentais por BITTENCOURT e colaboradores (1999, 2000). Os autores verificaram que o fungo, no segundo dia após a infecção, era evidenciado e isolado da hemolinfa e, no terceiro e quarto dias, era isolado e evidenciado nos órgãos. Com os experimentos os autores afirmaram que a principal forma de penetração de *M. anisopliae* no carrapato é através da cutícula.

O processo de infecção, também vem sendo alvo de pesquisa de nosso grupo (Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos, Centro de Biotecnologia da UFRGS). Resultados a partir de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica, confirmam dados anteriores, de que a penetração do fungo no carrapato é direta através da cutícula, seguindo sucessivas fases correspondentes às descritas na penetração do fungo na cutícula de insetos: adesão, germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (Figura 2; ARRUDA, 2005). A composição estrutural da cutícula, que corresponde ao principal obstáculo a ser vencido pelo fungo e o possível mecanismo de penetração, incluindo as enzimas envolvidas no processo, são mostrados na Figura 3. Os resultados corroboram que o processo de infecção do carrapato por *M. anisopliae*, assim como em insetos, é multifatorial. Em outro trabalho realizado pelo grupo, doze isolados de *M. anisopliae* foram avaliados quanto à sua capacidade de infecção do carrapato *B. microplus*, no qual a linhagem E₆, mostrou-se mais efetiva (FRAZZON *et al.*, 2000).

2.4 – Fatores de virulência de *M. anisopliae*

Levando em consideração a complexidade estrutural do exoesqueleto dos hospedeiros e as etapas de penetração envolvidas durante a infecção, com a provável combinação da pressão mecânica e da degradação enzimática, as enzimas hidrolíticas estão entre os principais fatores de virulência de *M. anisopliae* (ST. LEGER *et al.*, 1988). As enzimas provavelmente envolvidas no processo pertencem às classes das proteases, quitinases e lipases, entre outras, que são secretadas. Estas enzimas extracelulares já foram detectadas em pelo menos três fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* (ST. LEGER *et al.*, 1996b), *M. anisopliae* (PINTO *et al.*, 1997) e *Entomophthora spp* (GABRIEL, 1968).

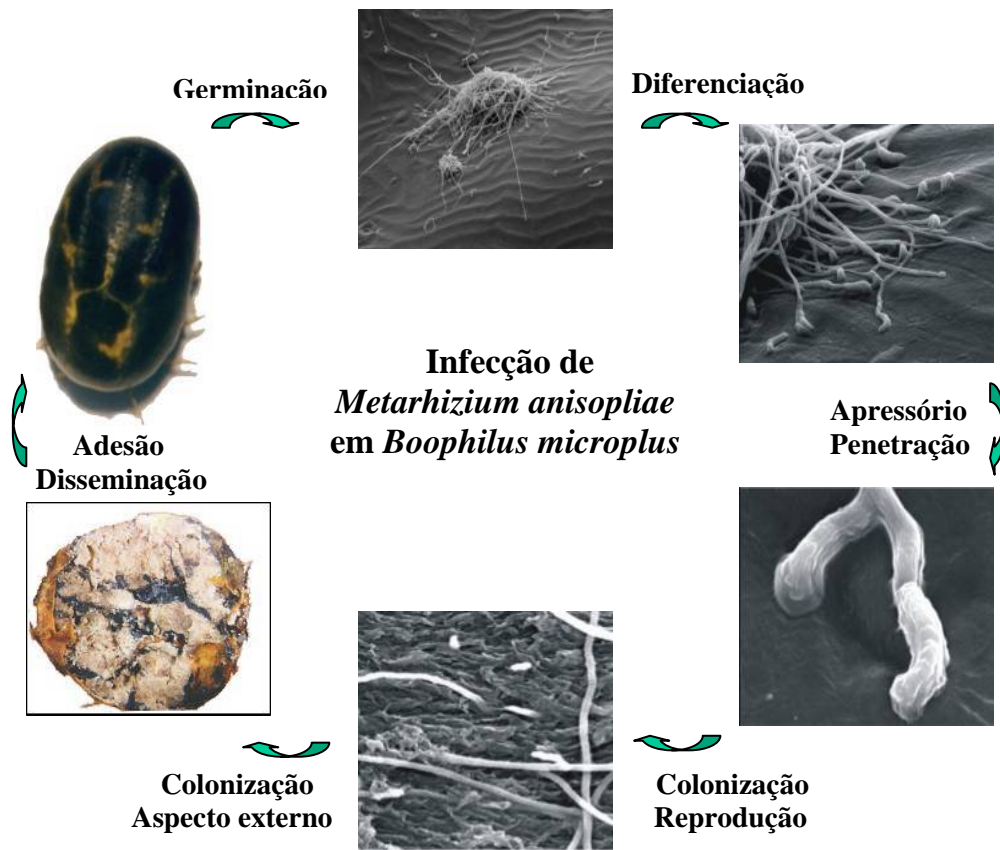


Figura 2 – Ciclo de vida do fungo *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus*.

Fotografias/Micrografias demonstrando as sucessivas fases da penetração do fungo *M. anisopliae* na cutícula do carrapato *B. microplus* (Figura cedida por A. SCHRANK e W. ARRUDA)

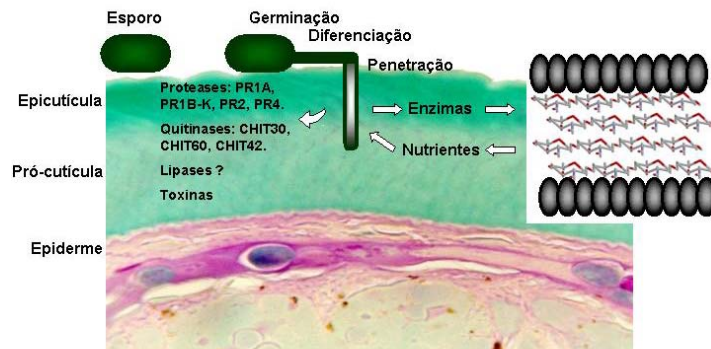


Figura 3 – Possível mecanismo de penetração do fungo *M. anisopliae* em *B. microplus*.

(Figura cedida por A. SCHRANK)

Micrografia demonstrando as estruturas que compõem a cutícula do carrapato *B. microplus*, em cor verde e, um esquema desta estrutura (à direita). Esquema demonstrando a penetração do fungo e as principais enzimas envolvidas no processo.

A possibilidade de correlação entre a virulência de fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula de insetos tem sido investigada. Entretanto, apenas uma protease, a Pr1A (denominação após JOSHI *et al.*, 1997), está comprovadamente envolvida na entomopatogenicidade de *M. anisopliae* (ST. LEGER *et al.*, 1996a). Além da protease Pr1A, provavelmente, outras proteases são fatores de virulência porque causam destruição localizada de proteínas da cutícula, o que permite uma rápida invasão do hospedeiro com concomitante provisão de nutrientes (ST. LEGER *et al.*, 1987; ST. LEGER *et al.*, 1996a; GILLESPIE *et al.*, 1998;). O gene que codifica a protease Pr1A foi clonado e caracterizado (ST. LEGER *et al.*, 1988). A seqüência do cDNA mostra que Pr1A é sintetizada como um precursor (40,3 kDa) contendo um peptídeo sinal e um propeptídeo. A proteína madura apresenta uma massa molecular calculada de 28,6 kDa. Quando cópias múltiplas do gene *pr1A*, fusionadas a um promotor constitutivo, foram inseridas em *M. anisopliae*, a sua eficiência no processo de infecção foi substancialmente aumentada, ocorrendo uma redução de 25% no tempo necessário para matar larvas de *Manduca sexta* em comparação com a linhagem selvagem (ST. LEGER *et al.*, 1996a). Entretanto, WANG e colaboradores (2002), analisaram mutantes espontâneos estáveis de *M. anisopliae* linhagem V275, não apresentando os genes *pr1A* e *pr1B* concomitantemente, com uma diminuição significativa das atividades de protease e elastase. Entretanto, estes mutantes eram capazes de infectar o hospedeiro *Galleria mellonella* em níveis similares aos da linhagem selvagem, mas com uma redução na patogenicidade para outro hospedeiro, *Tenebrio molitor*, demonstrando que estas proteases não são os únicos fatores envolvidos na patogenicidade e apresentam especificidade para com o hospedeiro (WANG *et al.*, 2002).

Foi isolado e caracterizado o gene que codifica uma segunda protease, Pr1B. A seqüência deduzida de aminoácidos apresenta similaridade com enzimas da família das subtilisinas e 54% de similaridade com a protease Pr1A. Embora tenha sido empregada a técnica de DD-RT-PCR, com o objetivo de identificar genes que são especificamente expressos quando *M. anisopliae* é cultivado em contato com cutícula de insetos, a participação da protease Pr1B no processo de infecção está ainda por ser determinada (JOSHI *et al.*, 1997).

M. anisopliae secreta outras proteases que podem também estar envolvidas no processo de infecção, juntamente com outras enzimas. Além dos genes de protease do tipo subtilisina *pr1A* e *pr1B* de *M. anisopliae* (JOSHI *et al.*, 1997), um banco de ESTs foi estabelecido por FREIMOSER e colaboradores (2003) e mostrou existir uma família de genes *pr1* e, até o presente momento, foram encontrados os genes *pr1C*, D, E, F, G, H, I, J e K

(*GenBank* – *NCBI*, números de acesso AJ251967, AJ251967, AJ419628, AJ272861, AJ272863, AJ273173, AJ273780, AJ274368 e AJ274144, respectivamente).

Foi sugerido que as diferentes isoformas das subtilisinas são oriundas de duplicação gênica e, provavelmente, estão relacionadas ao aumento da adaptabilidade em diferentes ambientes e à especificidade para hospedeiros (BAGGA *et al.*, 2004). Foi demonstrado que há um polimorfismo genético entre as isoformas das proteínas tipo subtilisina PR1A, PR1B e PR1C (BIDOCHKA & MELZER, 2000). Entretanto, a participação das proteínas codificadas por estes genes no processo de infecção não está confirmada experimentalmente.

A segunda classe de proteases com maior produção *in vitro* quando *M. anisopliae* é cultivado em cutícula de insetos é a de serino-proteases relacionadas com tripsinas (Pr2), as quais, são sugeridas ser isoformas (GILLESPIE *et al.*, 1998; ST. LEGER *et al.*, 1994). Duas destas isoformas de Pr2 mostrara estar associadas ao apressório, sugerindo que estas enzimas estão disponíveis durante os primeiros estágios da colonização da cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1994). Embora o gene que codifica uma destas serino-proteases tenha sido clonado e caracterizado, ainda não está completamente elucidada a função de Pr2 na patogenicidade. Entretanto, é possível que Pr2 seja relevante na indução ou na ativação de Pr1A (SMITHSON *et al.*, 1995).

As quitinases são enzimas hidrolíticas que, além de estarem envolvidas na morfogênese do fungo, podem também estar envolvidas na patogenicidade, como um fator de virulência. Diferentes quitinases são encontradas no sobrenadante de culturas que mimetizam as condições de infecção (PINTO *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 1998) ou mesmo durante o processo de infecção (SILVA *et al.*, 2005). Por outro lado, há autores que discordam do seu envolvimento na virulência, visto que, sua maior indução ocorre em um estágio posterior (48 h) à penetração do exoesqueleto dos hospedeiros (FREIMOSER *et al.*, 2003). ST. LEGER e colaboradores (1996b), purificaram e caracterizaram duas quitinases de *M. anisopliae*, uma de 43,5 e outra de 45 kDa. Tentou-se fazer uma localização ultraestrutural da quitinase de 45 kDa, entretanto, sua presença não foi confirmada no sítio de infecção, o que poderia implicar em uma suposta função em processos de morfogênese do fungo e não no processo infectivo (ST. LEGER *et al.*, 1996b). Esta quitinase de 45kDa é um ortólogo da quitinase CHIT42, codificada pelo gene *chit1* (BOGO *et al.*, 1998; BARATTO *et al.*, 2003). Em outro trabalho, o gene *chit1* foi superexpresso em *M. anisopliae* var. *acridum*, entretanto, o fungo não mostrou aumento de virulência para larvas do inseto *Manduca sexta*, o que corrobora com seu não envolvimento na patogenicidade (SCREEN *et al.*, 2001). Entretanto, em um trabalho com outro fungo entomopatogênico, *Beauverria bassiana*, a superexpressão de uma endoquitinase,

denominada Bchit1, ocasionou um aumento da virulência para um afídeo (*Myzus persicae*), diminuindo 50% a sua concentração letal e em 50% o tempo que levou para matar os insetos adultos (FANG *et al.*, 2005), o que contribui para a conclusão de que as quitinases são enzimas que estão potencialmente envolvidas na patogenicidade, e precisam de mais estudos.

As lipases e esterases, são também hidrolases que, supostamente, estão envolvidas no processo de infecção (ST. LEGER *et al.*, 1991a; CLARKSON & CHARNLEY, 1996), pois dentre os constituintes da cutícula estão lipídios e ácidos graxos. Recentemente, foi purificada e caracterizada uma lipase do sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae*, que foi induzida por diferentes lipídeos como fonte de carbono (BEYS SILVA *et al.*, 2005). No banco de ESTs estabelecido por FREIMOSER *et al.* (2003), foram identificadas seqüências parciais prováveis codificadoras de lipases (números de acesso CAA46807 e CAB91111) e esterases (CAB63910 e CAA20447).

Além das enzimas hidrolíticas, vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes de patogenicidade de *M. anisopliae*, entre os quais, as superóxido dismutases (SODs), enzimas que atuam como um sistema de defesa contra radicais livres de oxigênio (SCHRANK *et al.*, 1993), a presença de micovírus com genoma de dsRNA (BOGO *et al.*, 1996) e a secreção de destruxinas (WANG *et al.*, 2003).

As SODs são metaloenzimas que também vêm sendo relatadas como fatores de virulência, pois existem hospedeiros que utilizam a produção de espécies reativas de oxigênio que leva a morte celular, propiciando uma barreira a mais contra a infecção pelo fungo (SCHRANK *et al.*, 1993; GILCHRIST, *et al.*, 1998). As SODs, com a capacidade de conversão dessas espécies de oxigênio, para uma forma menos reativa, conferem uma contra-defesa para o fungo. *M. anisopliae* produz três tipos de SODs: MnSOD, FeSOD e CuZnSOD (BITTENCOURT *et al.*, 2004). Uma CuZnSOD foi purificada e um anti-soro contra ela foi utilizado para demonstrar a sua presença na parede celular do fungo, o que sugere uma função na tolerância das defesas do hospedeiro (BITTENCOURT *et al.*, 2004).

Algumas espécies de fungos são infectadas com micovírus com genoma de dsRNA. Existem exemplos na literatura onde é possível sugerir que a virulência de alguns fungos é influenciada, normalmente diminuída, pelo genoma viral (DE LA PAZ GIMENEZ-PECCI *et al.*, 2002). A presença de micovírus já foi constatada em algumas linhagens de *M. anisopliae* utilizadas em controle biológico no Brasil (BOGO *et al.*, 1996; DE LA PAZ GIMENEZ-PECCI *et al.*, 2002). FRAZZON e colaboradores (2000) também sugerem que linhagens de *M. anisopliae* livres de micovírus são mais infectivas para carrapatos.

M. anisopliae secreta, ainda, produtos metabólicos secundários, que apresentam importância na patogenicidade destacando-se as toxinas ciclodepsipeptídicas, conhecidas como destruxinas (DTX). Foram descritos diferentes tipos de DTX: A, B, C, D e E, e outras 27 variantes (WANG *et al.*, 2003). As DTXs apresentam grande poder inseticida, pois causam a paralisação do sistema digestório e a morte do hospedeiro (SAMUELS *et al.*, 1988). O hospedeiro exibe vários sintomas, incluindo inquietação, perda de coordenação e parada da ingestão de alimentos, os quais têm sido associados à ação das toxinas (KERSHAW *et al.*, 1999; LAVERLAM, 1999; AMIRI, 2000).

HSIAO & KO (2001) separaram e identificaram quatro DTXs, que foram produzidas em diferentes quantidades por isolados selvagens e mutantes do fungo, sendo a produção induzida significativamente por luz UV e por EMS (etil-metano-sulfonado). A destruxina do tipo A é a predominante. Em trabalho recente, foram investigados os fatores que alteram a produção de destruxinas, em isolados de *M. anisopliae*. Estes isolados produziram majoritariamente três tipos de DTXs, sendo que, em meios suplementados com peptona, ocorreu aumento da produção. Entretanto, a utilização de homogeneizado de larvas de insetos não induziu a sua produção, diferentemente do que seria esperado (WANG *et al.*, 2003). Linhagens muito virulentas produzem grandes quantidades de destruxinas, mas linhagens que produzem pouca toxina são também virulentas, sugerindo que as destruxinas não são os únicos determinantes da patogenicidade (WANG *et al.*, 2003).

Para a compreensão dos fatores envolvidos na virulência, têm-se dado ênfase a modelos experimentais que permitem uma visão global do padrão de expressão de *Metarhizium* ssp. frente aos seus hospedeiros (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004). FREIMOSER e colaboradores (2003), seqüenciaram e compararam duas bibliotecas de ESTs (*expressed sequence tag*) de *M. anisopliae*, uma da var. *anisopliae*, um patógeno com grande espectro de hospedeiros, e outra, da var. *acridum*, que é um patógeno específico de gafanhotos. As bibliotecas foram construídas a partir de cultivos que induzem a expressão de enzimas que degradam cutícula, durante 48 horas, e os resultados indicaram diferenças significativas na expressão entre as duas variedades (FREIMOSER *et al.*, 2003).

Nosso grupo também vem se dedicando a experimentos com ênfase semelhante (DUTRA *et al.*, 2004). Utilizando a técnica de RDA (*representational difference analysis*), foram analisadas as diferenças na expressão de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (linhagem E₆), que é altamente patogênico para o carrapato *Boophilus microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000), frente a dois tipos de cultivos de 18 horas, um mimetizando a condição de infecção, em meio suplementado com cutícula de carrapato, e outro em meio contendo glicose, demonstrado

repressão catabólica de vários genes do fungo. Assim, foi possível identificar algumas seqüências gênicas com maior nível de transcrição na carapaça do que no meio contendo glicose. Estas seqüências provavelmente possuem importância na virulência. Entre essas seqüências, destacam-se genes que codificam uma protease do tipo subtilisina (gene *pr1C*), uma proteína provavelmente envolvida na diferenciação de apressório (*pth11*), uma transaldolase e uma proteína de choque térmico / chaperona (HSP70; DUTRA *et al.*, 2004).

Essa abordagem mais global para o isolamento de seqüências com potencial envolvimento no processo de infecção requer um estudo mais detalhado para comprovar a sua participação na patogenicidade (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004).

2.5 - Quitina e quitinases

A quitina é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza. É encontrada freqüentemente constituindo exoesqueleto de insetos, carapaça de crustáceos, em concha de moluscos, em nematóides e como o principal componente da parede celular de fungos (CABIB, 1987). Estudos sobre a sua estrutura demonstram que ela é um polímero homogêneo e linear formado por ligações do tipo β - 1,4 de 2 -acetoamino-2-deoxi-D-glicopirranose (N-acetilglicosamina – NAcGlc), (BLACKWELL, 1988; Figura 4).

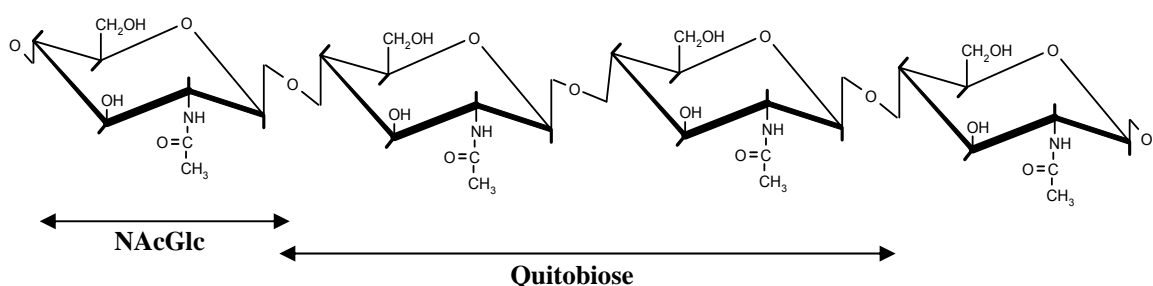


Figura 4 - Estrutura covalente da quitina.

As quitinases hidrolisam a quitina resultando na produção de oligômeros e monômeros de N-acetilglicosamina, que podem ser absorvidos e metabolizados por muitos organismos (ULHOA & PEDERBY, 1991). As enzimas capazes de hidrolisar a ligação existente entre os carbonos C1 e C4 de duas N-acetilglicosaminas consecutivas são genericamente denominadas de quitinases ou enzimas quitinolíticas (FLACH *et al.*, 1992). Embora não haja um consenso

em relação à nomenclatura mais específica destas enzimas, de acordo com os tipos de produtos liberados pela hidrólise do substrato, as quitinases podem ser classificadas em dois tipos principais: as endoquitinases (EC 3.2.1.14) e as exoquitinases (EC 3.2.1.30; Figura 5). As primeiras clivam a quitina em pontos internos aleatórios, produzindo multímeros de N-acetilglicosamina, e estas podem ser subdivididas em quitinases básicas e ácidas, também denominadas de classe I e de classe II, respectivamente, (SHAHABUDDIN & KASLOW, 1993). Já as exoquitinases catalisam a liberação progressiva de diacetilquitobiose. As endo e exoquitinases catalisam a quebra da quitina bruta, produzindo substratos para um terceiro tipo de enzima, que degrada os dímeros em monômeros de NAcGlc, as β -1,4-N-acetilglicosaminidases, também denominadas quitobiasas ou quitobiosidases (EC 3.2.1.52), segundo terminologia utilizada no *Enzyme Nomenclature* (BIELKA *et al.*, 1984). Esta subclasse de enzimas quitinolíticas hidrolisa apenas dímeros de NAcGlc e é incapaz de hidrolisar quitina bruta ou cristalina (BIELKA *et al.*, 1984; ST. LEGER *et al.*, 1991b; HARMAN *et al.*, 1992; SAHAI & MANOCHA, 1993; WERREN, 1996). A existência de várias enzimas corrobora a hipótese que elas atuam sinergisticamente sobre a quitina, tornando-a solúvel para que o fungo possa assimilá-la para a sua nutrição (ST. LEGER *et al.*, 1986b; 1991b; 1996b).

Na maioria dos fungos, onde a parede celular é composta basicamente por polissacarídeos como quitina e glicanas (BARTINICKI-GARCIA, 1968), enzimas quitinolíticas estão envolvidas principalmente nos processos de crescimento e diferenciação. Os fungos filamentosos também possuem quitinases que atuam em diferentes processos fisiológicos, entre os quais a dispersão de esporos, a autólise, a nutrição e o parasitismo (GOODAY *et al.*, 1992). As microfibrilas de quitinas são um componente estrutural importante da cutícula de insetos e representam uma barreira potencial à penetração de fungos entomopatogênicos. Desta forma, as enzimas envolvidas na degradação da quitina podem desempenhar uma função importante no processo de infecção (ST. LEGER *et al.*, 1986b). Enzimas com atividade quitinolítica são produzidas por *M. anisopliae* em níveis baixos pelas estruturas de infecção na superfície da cutícula e durante a fase inicial da penetração da cutícula, quando comparado com as proteases, mas altos níveis destas enzimas são encontrados nas zonas de degradação proteolítica (ST. LEGER *et al.*, 1986a; 1986b). Há evidências *in vitro* de que proteases e quitinases atuam de forma sinérgica na solubilização de cutículas. As quitinases estão provavelmente associadas a modificações na cutícula causadas pelo fungo enquanto esta barreira está sendo transposta (ST. LEGER *et al.*, 1986b). O sistema quitinolítico de *M. anisopliae* é, de modo geral, regulado por um mecanismo de

indução/repressão, onde a quitina induz tanto a síntese quanto a secreção de quitinases, enquanto a glicose é um repressor da síntese. A concentração do monômero NAcGlc também regula a síntese e secreção das quitinases. Baixas concentrações são indutores, enquanto altas concentrações têm papel repressor (MORAES *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2004).

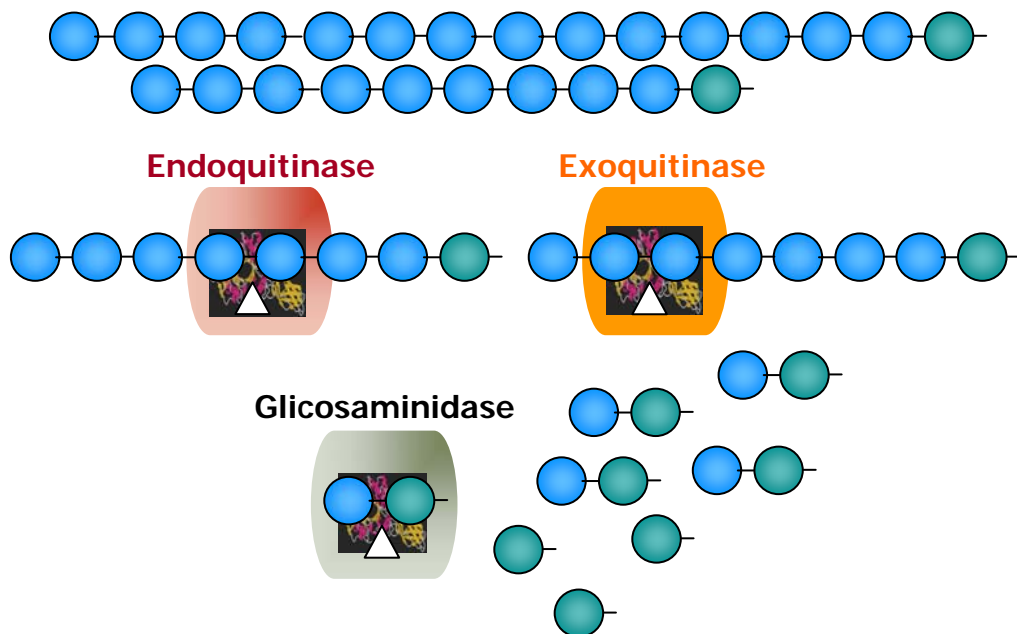


Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de ação das quitinases.

Em azul, estão representadas as fibras da quitina, e em verde, os monômeros de NAcGlc, compreendendo sua fração terminal. Estão representadas as enzimas endoquitinase, em cor de vinho, exoquitinase, em laranja, e glicosaminidase, em cinza. Modificado de SAHAI & MANOCHA (1993).

2.6 – Quitinases purificadas de *M. anisopliae*

Duas enzimas de *M. anisopliae* linhagem ME1, envolvidas no processo de degradação de quitina foram purificadas a partir de cultivos em quitina bruta por ST. LEGER e colaboradores (1991b). Uma destas enzimas, com 33 kDa (CHIT33), pI 5,4-8,6 e pH ótimo de 5,3, assemelha-se a quitinases de bactérias. A segunda enzima de 110 kDa (CHIT110), pI 6.4 e pH ótimo de 5,0, é uma quitobiase (glicosaminidase) que hidrolisa quito-oligossacarídeos, principalmente a quitobiase (ST. LEGER *et al* 1991b).

Este grupo detectou ainda outras duas quitinases de 43,5 e 45 kDa (pI 4,8) em sobrenadantes de culturas de *M. anisopliae* em presença de cutícula de inseto como fonte de carbono. As seqüências N-terminais foram obtidas e demonstraram ser idênticas entre si, e muito similares à quitinase CHIT42 de *Trichoderma harzianum* (CARSOLIO *et al.*, 1994; ST. LEGER *et al.*, 1996b; Tabela 2).

Foi demonstrada a presença de pelo menos três enzimas com atividade quitinolítica na linhagem E₆ de *M. anisopliae*. Uma destas enzimas, a CHIT30, foi purificada e apresentou atividade de degradação de quitina coloidal, tetrâmeros, trímeros e dímeros de NAcGlc. Essa quitinase purificada foi a primeira enzima descrita apresentando atividade bifuncional de exo e endoquitinase. Ela é altamente induzida por quitina coloidal e reprimida por NAcGlc (PINTO *et al.*, 1997; Tabela 2). Uma outra quitinase foi demonstrada para a linhagem E₆, empregando géis não desnaturantes na detecção da atividade de quitinases (MOREIRA, 1998).

A quitinase CHIT42 de *M. anisopliae*, codificada pelo gene *chit1* (BOGO *et al.*, 1998), foi expressa em *Escherichia coli* e, parcialmente caracterizada, demonstrando ser uma endoquitinase ácida (pH ótimo de 4,5 a 5,5; BARATTO *et al.*, 2003). A proteína heteróloga expressa com atividade, compreende a proteína predita madura, ou seja, sem o peptídeo sinal (BOGO *et al.*, 1998; BARATTO *et al.*, 2003). A quitinase CHIT42 é, provavelmente, ortóloga das quitinases com 43,5 e 45 kDa, pois apresenta apenas três alterações de resíduos de aminoácidos, preditos a partir do gene *chit1*, de vinte determinados do N-terminal das duas quitinases (ST. LEGER *et al.*, 1996b; BOGO *et al.*, 1998; Tabela 2).

KANG e colaboradores (1999) purificaram e caracterizaram uma nova quitinase de *M. anisopliae*, linhagem ATCC 20500, de aproximadamente, 60 kDa (pH ótimo 5,0). A partir de ensaios enzimáticos, a CHIT60 demonstrou atividades tanto de endo como de exoquitinase (KANG *et al.*, 1999), a exemplo da CHIT30 (PINTO *et al.*, 1997, SILVA *et al.*, 2005).

Além dessas quitinases purificadas, acredita-se que existam outras, corroborando o alto grau de complexidade do sistema quitinolítico de *M. anisopliae*. Foi demonstrado em géis de atividade contendo glicol-quitina como substrato, que uma linhagem de *M. anisopliae* altamente secretora, produzia uma mistura complexa de enzimas quitinolíticas quando o fungo era cultivado em condições de indução. A presença de aproximadamente 10 isoenzimas foi sugerida (ST. LEGER *et al.*, 1993). Aparentemente, estas bandas múltiplas de atividade resultam da simples variação de migração devido a diferentes graus de glicosilação ou de clivagem proteolítica, visto que, nos ESTs obtidos por FREIMOSER e colaboradores (2003) apenas cinco diferentes genes foram detectados e na linhagem E₆ apenas seis bandas de atividade quitinolítica são detectadas (SILVA *et al.*, 2005).

2.7 - Genes de quitinases isolados de *M. anisopliae*

O gene *chit1* e o seu cDNA completo, que codifica uma quitinase do fungo *M. anisopliae* foram isolados e caracterizados (BOGO *et al.*, 1998; Tabela 2). Foi o primeiro trabalho publicado de um gene codificando uma enzima quitinolítica nesse fungo. O gene *chit1* é interrompido por três pequenos íntrons, típicos de fungos, apresentando uma ORF de 1.521 pb, que codifica uma proteína de 423 aminoácidos. Os 35 primeiros aminoácidos apresentam características de peptídeo-sinal. Dessa forma, quando madura, essa proteína apresenta uma massa molecular de 42 kDa e pI de 5,8. Segundo análises de hibridização, uma única cópia do gene *chit1* está presente no genoma de *M. anisopliae*.

Com o seqüenciamento de ESTs da linhagem ME1 de *M. anisopliae* var. *acridum*, FREIMOSER e colaboradores (2003), obtiveram a seqüência completa de dois genes de quitinases, o gene *chi1*, ortólogo do gene *chit1*, e o gene *chi3*, o qual codifica para uma enzima predita de 34 kDa, e ainda, uma seqüência parcial de outro gene, *chi2*. Além desses, outros dois genes foram identificados no trabalho, um codificando um precursor de quitinase 3, semelhante a de *N. crassa*, e outro, com identidade a uma quitinase de *T. harzianum*.

Outro gene de quitinase de *M. anisopliae* linhagem ATCC 20500 foi descrito por KANG e colaboradores (1998; gene *chi11*; Tabela 2, em vermelho), entretanto, em um trabalho de regulação da quitinase *yheB* de *E. coli* (FRANCETIC *et al.*, 2000), os autores sugerem que o gene *chi11* seria um artefato da construção da biblioteca do fungo, visto que, a seqüência do gene apresenta em torno de 90% de identidade com a quitinase de *E. coli* K-12 (número de acesso U18997), incluindo as regiões flanqueadoras não-traduzidas.

Tabela 2 - Quitinases e genes de quitinases isolados de *M. anisopliae* e suas principais propriedades (- não-determinado).

QUITINASE	pH	pI	Substrato	Atividade	N-terminal	Tempo / Indução	Indução / Repressão	Linagem
CHIT30 (PINTO <i>et al.</i> , 1997)	4,5 - 5,0	5,3	Quitina bruta; oligômeros	Exo / Endo	-	48 h	Quitina / Glicose	E6
CHIT33 (ST. LEGER <i>et al.</i> , 1991b)	5,3	5,4 - 8,6	Quitina coloidal e cristalina	Endo	-	-	Quitina -	ME1
CHIT43,5 (ST. LEGER <i>et al.</i> , 1996b)	-	-	Glicol-quitina	Endo	AGGYVNAVYFY TNGLYLSNYQPQ	-	Cutícula -	ME1
CHIT45 (ST. LEGER <i>et al.</i> , 1996b)	-	-	Glicol-quitina	Endo	AGGYVNAVYFY TNGLYLSNYQPQ	40-60 h	Cutícula -	ME1
CHIT60 (KANG <i>et al.</i> , 1999)	5,0	-	Quitina coloidal e cristalina / carapaça	Exo / Endo	NTGSWNGVNVE	4 dias	Quitina -	ATCC 20500
CHIT110 (ST. LEGER <i>et al.</i> , 1991b)	5,0	-	Quitobi., quitotri. quitotetraose	quitobiase	-	constitutivo	Inibida por NAcGLc	ME1
CHIT42 heteróloga (BARATTO <i>et al.</i> , 2003)			Quitina coloidal	Endo	AGGYVNAVYF TNWGIYGRNYQP			
GENES	Banco	pI	-	Introns / Cópias	N-terminal	Aminoácidos	-	Linagem
<i>Chi1</i> 42 KDa (BOGO <i>et al.</i> , 1998)	cDNA/ genômi co	5,8	-	3 íntrons / cópia única	AGGYVNAVYF TNWGIYGRNYQP	423 aa	-	E6
<i>Chi2</i> Parcial (FREIMOSER <i>et al.</i> , 2003)	cDNA	-	-	- -	LRALAGVGLVGLASG VPFTDNISIKPRQAP	414 aa Parcial	-	ME1
<i>Chi3</i> 34 kDa (FREIMOSER <i>et al.</i> , 2003)	cDNA	-	-	- -	MFVRNALAVTGLLAA LTQAAPDEGRASG	317 aa	-	ME1
<i>Chi11</i> 58 kDa (KANG <i>et al.</i> , 1998)	cDNA	-	-	- cópia única	MLFSMVMFTERWW VGSKDCPRVPALEN	523 aa	-	ATCC 20500

2.8 - Função e regulação de quitinases de fungos filamentosos

O processo de degradação da quitina em microrganismos é complexo e envolve um sistema de expressão dos genes de quitinases altamente regulado (KEYHANI & ROSEMAN, 1999). O mecanismo proposto para a regulação da expressão gênica de quitinases em fungos segue o modelo indutor-repressor, onde a quitina e os produtos de sua degradação são indutores e a glicose atua como repressor, efeito conhecido como repressão catabólica por glicose (CARLSON, 1999). SAHAI & MANOCHA (1993), demonstraram que a secreção constitutiva de quitinases também ocorre, sugerindo que níveis basais de quitinases podem dar início ao processo de hidrólise da quitina.

Em fungos filamentosos, algumas quitinases tiveram suas funções determinadas e sua regulação elucidada. Acredita-se que as quitinases, nesses organismos, além da possível função na entomopatogenicidade, fitoparasitismo ou micoparasitismo, tenham funções em processos fisiológicos que requerem a digestão da parede celular, como germinação de esporos, crescimento na ponta da hifa, ramificações e autólise das hifas (GOODAY, 1990; GOODAY *et al.*, 1992; TAKAYA *et al.*, 1997).

Em *Aspergillus nidulans*, foi isolado e caracterizado o gene *chiA*, que codifica para uma quitinase de 69 kDa (TAKAYA *et al.*, 1997). A inativação do gene não causou alterações morfológicas nos conidióforos ou nas hifas, entretanto, a germinação dos conídios e o crescimento das hifas diminuíram substancialmente. Elementos reguladores da expressão do gene foram investigados, utilizando uma região de 600 pb a montante do sítio de início da transcrição, e a proteína repórter β -galactosidase. O gene foi expresso durante o crescimento das hifas, tendo a sua expressão aumentada duas vezes durante o desenvolvimento dos conidióforos, indicando que a quitinase CHIA de *A. nidulans* é regulada temporalmente na morfogênese (TAKAYA *et al.*, 1997). Em *A. fumigatus*, um importante micopatógeno de seres humanos, foi inativado o gene *chiB*, que codifica uma quitinase de 45 kDa, semelhante à de bactérias. O mutante não apresentou alterações no crescimento ou na morfologia em relação ao selvagem, entretanto, na fase de autólise a expressão de quitinases foi bem inferior que no selvagem, indicando sua indução nessa fase (JAQUES *et al.*, 2003).

Foram também isolados dois genes de quitinases do fungo *Coccidioides immitis*, um agente etiológico de doenças respiratórias, genes *cts1* e *cts2* (PISHKO *et al.*, 1995). Com a finalidade de avaliar a sua participação na morfogênese, o gene *cts1* foi silenciado neste organismo (REICHARD *et al.*, 2000). Apesar do gene *cts1* ter a sua expressão aumentada durante a formação do endosporo, o mutante obtido não apresentou mudanças na virulência

nem na morfogênese. Entretanto, a análise comparativa da atividade de quitinase da linhagem parental e no mutante sugere que a ausência do gene *cts1* pode ser compensada com a maior expressão do gene *cts2*.

Os mecanismos de regulação de alguns genes que codificam enzimas hidrolíticas de *Trichoderma spp.* foram exaustivamente estudados. ZEILINGER e colaboradores (1999), utilizando a proteína repórter GFP sob controle da região 5' reguladora dos genes de *T. harzianum ech42* (que codifica uma endoquitinase de 42 kDa) e *nag1* (codificando uma N-acetilglicosaminidase), estudaram a expressão desses genes durante a infecção do fungo *Rhizoctonia solani*. Os autores observaram que a indução do gene *ech42* é anterior, enquanto a do gene *nag1* é posterior ao contato físico com o hospedeiro. O gene *ech42* apresenta uma alta expressão em presença do sobrenadante da cultura de *Rhizoctonia solani* com quitooligosacarídeos, possivelmente produzidos por atividades constitutivas da CHIT42 ou de outras quitinases.

MACH e colaboradores (1999), avaliaram a expressão dos genes ortólogos em *Trichoderma atroviride* (= *Trichoderma harzianum* P1). O gene *nag1* foi expresso em presença de parede celular do fungo *Botrytis cinerea* e oligômeros derivados da degradação de quitina, mesmo sendo adicionadas diferentes fontes de carbono. Entretanto, o gene *ech42* não foi induzido com a adição de quitooligômeros, mas apresentou alta expressão em cultivos prolongados por escassez de fontes de carbono, independentemente do cultivo ser em glicose ou glicerol. Os resultados indicam que a indução do gene na escassez da fonte de carbono não é devida a ausência da repressão catabólica por carbono. Além disso, o gene foi também induzido por estresse, como baixas temperaturas, pressão osmótica e presença de etanol.

Os genes *ech42* e *nag1* de *T. harzianum* juntamente com o gene *gluc78* (que codifica uma 1,3-β-glicosidase), também foram alvo de estudo feito por DONZELLI & HARMANN (2001). Os resultados divergiram parcialmente dos trabalhos anteriores. O gene *gluc78* foi induzido por escassez de nitrogênio, enquanto, para os genes *ech42* e *nag1*, além da escassez de nitrogênio, foi necessária a presença de quitina para a indução. A escassez de amônio e glicose resultou na expressão e na secreção prematura de enzimas quitinolíticas degradadoras da parede celular. De forma geral, estas enzimas, incluindo a quitinase CHIT42, têm a expressão reprimida por nitrogênio e os efeitos da quitina na expressão, são alterados pela variação do nível de amônio e de glicose no meio de cultura.

A função da quitinase CHIT42 de *T. virens* foi avaliada através da inativação e da superexpressão do gene *ch42*. Os resultados indicam que, em ambos transformantes, não

houve alterações na razão do crescimento, na esporulação, na produção de antibióticos, na eficiência de colonização e na sobrevivência no solo, em relação ao selvagem. Entretanto, a capacidade de infectar *Rhizoctonia solani* foi diminuída, no mutante com o gene inativado, e aumentada, quando o gene era superexpresso, comprovando a sua participação na patogeneidade (JONG-MIN *et al.*, 1999).

Outro gene de *T. harzianum* analisado foi o gene *chit36*, que codifica uma endoquitinase de 36 kDa (CHIT36; ULHOA *et al.*, 1991; VITERBO *et al.*, 2001). Sua superexpressão demonstrou seu amplo poder antifúngico, com provável função na micopatogenicidade (VITERBO *et al.*, 2001). VITERBO e colaboradores (2002) analisaram a regulação do gene *chit36*, utilizando a sua região 5' regulatória e o gene repórter *gfp*. Os resultados indicaram que houve repressão em presença de glicose e nitrogênio e indução em condições de estresse, em presença de quitina coloidal e de NAcGlc.

O gene *Bchit1*, do fungo entomopatogênico *Beauverria bassiana*, que codifica para uma quitinase de 33 kDa, trata-se de um ortólogo do gene *chit36* de *T. harzianum*. Esta quitinase foi altamente reprimida por glicose e sua expressão foi induzida desde o início do seu cultivo na ausência de glicose. A sua superexpressão aumentou a eficiência de infecção (FANG *et al.*, 2005).

O sistema quitinolítico de *M. anisopliae* é regulado por um mecanismo de indução-repressão, onde a quitina induz tanto a síntese quanto a secreção de quitinases, enquanto a glicose é um repressor da síntese (BARRETO *et al.*, 2004). A concentração do monômero de NAcGlc também regula a síntese e a secreção das quitinases. Baixas concentrações de NAcGlc (0,5%) são indutoras, enquanto altas concentrações (1%) têm papel repressor (MOREIRA, 1998; MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004). Esse modelo de regulação é mostrado na Figura 5. Acredita-se que, em *M. anisopliae*, assim como em outros fungos entomopatogênicos, as quitinases possivelmente envolvidas no processo de infecção são requeridas somente por períodos curtos durante a penetração na cutícula dos hospedeiros e são fortemente reguladas pelos produtos de degradação da quitina (ST. LEGER. & JOSHI, 1997; ST LEGER *et al.*, 1998).

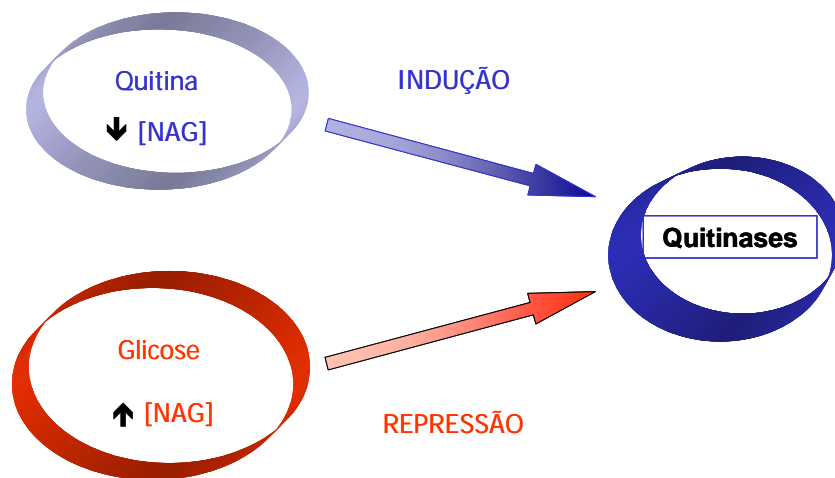


Figura 6 - Mecanismo de regulação de quitinases.

A flecha azul indica indução e a vermelha representa repressão. As flechas verticais indicam as concentrações baixas (0,1%) ou altas (1%) de NAcGlc.

A exo/endoquitinase CHIT30 é altamente induzida por quitina coloidal e reprimida por concentrações baixas de NAcGlc (PINTO *et al.*, 1997). SILVA e colaboradores (2005) purificaram esta quitinase e produziram soro anti-CHIT30. A partir de experimentos de *western* foi possível determinar a sua regulação, sendo os resultados similares aos obtidos anteriormente por PINTO e colaboradores (1997). A secreção é induzida por NAcGlc em baixas concentrações (0,2%), por carapaça de carrapato e por quitina e reprimida por glicose 1% e altas concentrações de NAcGlc (1%). Utilizando o soro anti-CHIT30, foi isolado o gene que a codifica. A análise da seqüência de DNA mostrou ser um ortólogo do gene *chi3* de *M. anisopliae* var. *acridum* (GenBank – NCBI, número de acesso AJ293218). Em experimentos de imuno-histoquímica foi demonstrada a presença da quitinase CHIT30 produzida por *M. anisopliae* linhagem E₆ no sítio de infecção no carrapato *B. microplus* (SILVA *et al.*, 2005).

Duas quitinases de *M. anisopliae* foram estudadas por ST. LEGER *et al.* (1991a). A primeira, de 33 kDa, assemelha-se a quitinases de bactérias, sendo que a sua secreção é altamente estimulada por NAcGlc e inibida por hialina. A segunda enzima é uma β -1,4-N-acetilglicosaminidase que hidrolisa quito-oligosacarídeos e apresenta expressão constitutiva, sendo produzida mesmo em meio de cultura sem quitina, e tem a sua atividade inibida por NAcGlc e é incapaz de hidrolisar quitina cristalina (ST. LEGER *et al.*, 1991a).

O gene *chit1* (quitinase CHIT42) de *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou uma indução em presença de quitina e repressão em presença de glicose ou NAcGlc em concentrações altas e em cultivos prolongados (BOGO *et al.*, 1998). A expressão do seu ortólogo, gene *chi1*, em *M. anisopliae* var. *acidum*, não foi detectada nas fases iniciais da infecção, sendo fortemente sugerido, o seu não envolvimento na patogenicidade (ST. LEGER *et al.*, 1996b; SCREEN *et al.*, 2001; FREIMOSER *et al.*, 2003). FREIMOSER *et al.* (2003), analisando e comparando as *ESTs* (*Expressed sequence tags*) de duas variedades de *M. anisopliae* (var. *anisopliae* e var. *acidum*), demonstraram diferenças na expressão de genes e, também que, entre os dez transcritos mais abundantes em *M. anisopliae* var. *acidum*, encontram-se três genes correspondentes a quitinases (gene *chi1*, ortólogo do gene *chit1*, gene *chi2* e gene *chi3*) e um gene de quitosanase (gene *csn1*), enquanto que, entre os dez transcritos mais abundantes em *M. anisopliae* var. *anisopliae*, não foi encontrado qualquer codificando quitinase.

Segundo ST. LEGER e colaboradores (1998), os fungos filamentosos são capazes de modificar o pH do meio, sugerindo que este fator regula a expressão de genes de virulência de *M. anisopliae*, sendo as proteases secretadas em pH básico e as quitinases em pH ácido.

Sendo o sistema quitinolítico de *M. anisopliae* constituído de um complexo de enzimas, a obtenção de provas conclusivas sobre o envolvimento dessas enzimas no processo de penetração e nos demais processos fisiológicos de *M. anisopliae* depende de estudos básicos, para os quais se tornam necessárias a purificação e a caracterização de cada proteína, o isolamento dos genes e a análise das suas seqüências reguladoras. Seria ainda necessário comprovar a presença da enzima no sítio de penetração, e finalmente, a superexpressão da quitinase deveria aumentar a DL50 e a virulência, diminuindo assim, o tempo de penetração da linhagem geneticamente modificada em relação à linhagem selvagem.

2.9 - Prováveis seqüências reguladoras do gene *chit1* e de outros genes de quitinases

Até o momento, não há dados na literatura descrevendo elementos reguladores envolvidos na ativação da expressão gênica em resposta à quitina em fungos. Desta forma, nos estudos sobre regiões regulatórias de genes de quitinases, são enfatizados os elementos sabidamente envolvidos na expressão gênica em resposta à glicose e ao nitrogênio, já que estes apresentam uma regulação negativa sobre a expressão das quitinases em *M. anisopliae*.

BOGO (1999) determinou a seqüência da região 5' flanqueadora do gene *chit1* (BOGO *et al.*, 1998; Figura 7) e identificou alguns possíveis elementos de fatores gerais de transcrição (*core promoter consensus sequences*) *CAAT box* e *TATA box*, localizados na distância apropriada a montante do códon de início de transcrição (G +1). Foi mapeada uma região rica em pirimidinas (*CT box*), localizada a 71pb a montante ao códon de início de tradução. Também foi identificada a presença de um possível elemento ATTCAAAT muito próximo ao consenso ATGCAAAT, caracterizado como elemento de regulação de transcrição em eucariotos, posicionado a 30 pb a montante do códon de início de tradução (Figura 7). Os promotores dos genes *pgk* de *A. nidulans* e *P. crysogenum* (STREATFIELD *et al.*, 1992) e o promotor do gene *pk2* de *Rhizopus niveus* (TAKAYA *et al.*, 1995) apresentam seqüências bastante similares a este elemento. Também foram identificados no gene *chit1* os possíveis elementos CREA (GTGGAG), GATA-1 (TATC) e GATA-2 (GATA), localizados nas distâncias respectivas de 601 pb, 366 pb e 15 pb a montante ao códon ATG de início de tradução. Embora não se tenha mapeado experimentalmente o sítio de início de transcrição, foi também identificado um possível elemento (TCATCAAT) semelhante ao elemento de consenso de início da transcrição TCATCANC (EBERLE & RUSSO, 1994), posicionado, a 56 pb a montante do códon de início de tradução.

Entre os prováveis elementos reguladores encontrados na região flanqueadora 5' do gene *chit1* está o elemento GATA (seqüência de consenso HGATAR), o qual é sítio de ligação dos fatores GATA. Em plantas e metazoários, são encontrados fatores GATA, uma classe de ativadores ou repressores transcricionais que também estão envolvidos na regulação de genes relacionados às vias de utilização de nitrogênio em fungos, como *A. nidulans* (GONZALES *et al.*, 1997). Os fatores AREA da classe GATA estão envolvidos na remodelagem da cromatina no promotor dos genes *niaD* e *niiA* deste organismo (MUROPASTOR *et al.*, 1999). Os fatores GATA são caracterizados por um motivo de ligação ao DNA altamente conservado, o dedo-de-zinco de Cys (*zinc finger*), seguido por um domínio básico (OMICINSKI *et al.*, 1993). Em fungos, os fatores GATA estão envolvidos em diversos processos como a regulação do metabolismo do nitrogênio (FU *et al.*, 1995), a repressão da biossíntese de sideróforos pela interação de reguladores de transcrição (AN *et al.*, 1997) e a ativação transcricional de processos induzidos por luz (BALLARIO *et al.*, 1996).

O fator GATA melhor estudado em fungos é a proteína AREA de *A. nidulans* e sua homóloga NIT2 em *N. crassa*. Estas proteínas são necessárias para a regulação da transcrição de quase todos os genes envolvidos na utilização de fontes de nitrogênio nestes organismos

(FU *et al.*, 1995). A repressão da expressão desses genes por amônio ou glutamina, acredita-se, ocorre pela formação de um complexo com AREA, que evita a sua ligação ao DNA, e a glutamina atua na repressão juntamente com uma proteína secundária (PLATT *et al.*, 1996).

```

GCATGCGCAGGCTTCAGACTTCATGTGGGCTTTGTAGTTTCTGCACAGCTTCACAACCCGCCCTCTGGAA 70
CCTCCCCACCATCTTTTACCGTCTCATGTGAGGTTTTTGCACACATGCATGGAGCACGGAAC TTGGTTA 140
TGGGGTGTAGTACGTACTTTTGACATCTTGTCACTTCCTGTCCATTGCTCATGCGTCGTCTCTGTTTCATCG 210
CCAAACGTGCCAAGCTGGAGCGCTTGCTGCGATGCTCCCAGTTGCAAATGGCCGCACGGAATGAGAGAA 280
CREA
GCATCCTTTTATGGACTGCACCAACTACTCAGGTAGCCACGAATAGGCTATGTGTGGTCAATTAGTGAGT 350
CGGTATTTTTCAATTGAGCGCATCAGCAACGTTGCCGAGCCGAACGATGAGTACTGTCTCAGCCCAGGGC 420
GAGCCTACCAGCCAGGTATGCCTCCTATCCCAGTCGAGACTATCAGAGATCAGCATTGCCGAGTAACCA 490
GATA-1
GTGGTATGCTAAGGAATGGATGAGTGGAATGTTCCCACCCTCTCTAACCTGCCTAATGGTCTTCCATGC 560
TAGATGAGACGGCAAGCCTTTCTTCGCCCTCAACCATGCTACCCATGTTGACCAATTCCTTATCAACTACC 630
CAAT box
GAATACCTGCGAAGTCAACGTCGTCGTGGTCTTGATATAAATAGGGCCACATTCCCTTCGAGGTAGTTCAC 700
TATAAA box
GGAAGACACGCTACCACTACATCACTCCCTACATATCCCCCCCTTTTTCTACCCGGCCCTGGTGGCTCTT 770
CT box
TCATCAATTGCACAAGCACTTCTATTCAAATTACAGTACAGAGATACTCGGGTCAACGATatgccgtcg 840
Box início Transcrição GATA-2 M P S

```

Figura 7 - Região flanqueadora 5' do gene *chit1* e prováveis elementos envolvidos na sua regulação.

Seqüência de nucleotídeos da região flanqueadora 5' do gene *chit1* de *M. anisopliae*. Estão realçadas em azul as seqüências dos possíveis elementos envolvidos na regulação da expressão do gene *chit1* de *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998; BARATTO, 2001). As seqüências destacadas com diferentes cores representam prováveis elementos em particular: vermelho CREA, azul GATA, verde escuro região ricas em pirimidinas, verde claro *CAAT box*, amarelo *TATA box* e cinza início de transcrição.

Há evidências substanciais de que ocorrem interações diretas e indiretas entre as proteínas NIRA e AREA. NIRA atua como um ativador e AREA atua como desrepressor da expressão. O fator NIRA (*A. nidulans*), assim como NIT4 (*N. crassa*), é ativador específico da transcrição de genes que codificam permeases e outras enzimas de vias de assimilação de nitrato e se ligam na seqüência de consenso CTCCGHGG (PUNT *et al.*, 1995). Esses fatores estão envolvidos na regulação de genes que codificam as enzimas nitrato e nitrito redutase em *A. nidulans* (*niaD* e *niaA*; PUNT *et al.*, 1995).

Em *M. anisopliae*, foi demonstrado que a proteína NRR1 é um elemento regulador de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio. A proteína NRR1 de *M. anisopliae* apresenta alta similaridade com a proteína NIT2 de *N. crassa*. Utilizando

métodos genéticos, foi demonstrada a equivalência funcional entre os genes *nrr1* de *M. anisopliae* e *areA* de *A. nidulans* (SCREEN *et al.*, 1997).

Outro provável elemento regulador também encontrado na região flanqueadora 5' do gene *chit1* é o elemento CREA (seqüência de consenso SYGGRG), reconhecido pelo fator de transcrição CREA (genes *creA*, *creB* e *creC*), em *A. nidulans*. Este é um regulador negativo que intermedeia a repressão do catabolismo neste organismo, na presença de glicose. O fator CREA regula a expressão de permeases e outras enzimas específicas envolvidas na utilização de prolina como fonte de carbono e/ou nitrogênio (CUBERO & SCAZZOCCHIO, 1994). CREA também regula a expressão dos genes das enzimas pectina e pectato-liase (HO *et al.*, 1995), o elemento também está presente no promotor do gene *gpdA* deste organismo (PUNT *et al.*, 1990). O gene *creA* (DAWZER & KELLY, 1991) codifica uma proteína com dois motivos dedos-de-zinco muito similares áqueles presentes em um regulador transcricional de leveduras (MIG1), que está envolvido na repressão catabólica de alguns genes deste organismo (genes *gal4* e *suc1*; NEHLIN *et al.*, 1991).

Em *M. anisopliae*, foi isolado e seqüenciado o gene *crr1*, ortólogo do gene *creA* de *A. nidulans*. A partir de experimentos de complementação, foi possível demonstrar que a proteína CRR1 substitui parcialmente a proteína CREA em *A. nidulans* (SCREEN *et al.*, 1997). Neste trabalho, os autores descreveram também a seqüência da região reguladora do gene *pr1A* de *M. anisopliae*, onde foi possível identificar vários elementos controladores de transcrição, também presentes na região reguladora do gene *chit1*, e comprovar a existência de dois sítios que aos quais se liga a proteína CREA de *A. nidulans*, em ensaios *in vitro*.

Análises semelhantes foram realizadas em *Trichoderma ssp.*, com a região 5' reguladora do gene *ech42* (CARSOLIO *et al.*, 1994; LORITO *et al.*, 1996; BRUNNER *et al.*, 2003). Primeiramente, em *T. harzianum* foi avaliada a interação do repressor catabólito CRE1 com a região reguladora do gene *ech42*, em experimentos de competição utilizando oligonucleotídeos em diferentes condições de cultivo. Foi observado que ocorria a interação, quando a parede celular do hospedeiro não estava presente na cultura, provavelmente, envolvendo cinco sítios de reconhecimento por CRE1, encontrados no promotor (LORITO *et al.*, 1996). BRUNNER e colaboradores (2003), utilizando o gene repórter *goxA* de *A. nidulans* e a região reguladora do gene *ech42*, comprovaram que a deleção de uma região de 130 pb que contém um elemento de repressão CRE1, um elemento de resposta ao estresse (AGGGG) e sítios de regulação da conidiação do tipo BrlA de *A. nidulans*, provocou um aumento de três vezes na expressão, em condições de escassez de carbono. Enquanto a deleção de todos os elementos reguladores aumentou em cinco vezes a expressão nesta condição. A análise *in*

vitro de ligação ao DNA mostrou que apenas os sítios do tipo BrlA se ligam proteínas de extratos livres de células de *T. atroviride*, cultivado em escassez de carbono, identificando assim um novo regulador de transcrição de gene de quitinase neste organismo.

É importante, portanto, ampliar os conhecimentos já obtidos sobre as quitinases e seu sistema de regulação da expressão, pois além do interesse científico, servindo como modelo de estudo para fungos filamentosos e eucariotos, é um requisito importante para o melhoramento de linhagens e sua aplicação com maior eficiência no controle biológico, bem como para determinar se e quais quitinases participam do processo de penetração nos hospedeiros.

2.10 Objetivos

2.10.1 Objetivo Geral

Estudar a participação de quitinases de *M. anisopliae* em processos fisiológicos, como o crescimento, ou na infecção de um de seus hospedeiros, o carrapato *Boophilus microplus*.

2.10.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar o gene *chi2* da linhagem E₆ de *M. anisopliae*
- Avaliar o padrão de transcrição dos genes *chit1* e *chi2* em condições vegetativas e de infecção de *M. anisopliae*
- Obter transformantes para superexpressão do gene *chit1* em *M. anisopliae*
- Obter transformantes com construções contendo a região promotora do gene *chit1* de *M. anisopliae* para caracterizar e localizar os prováveis elementos de regulação, utilizando a proteína repórter sGFP.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos, plasmídeos, bancos de DNA e oligonucleotídeos

3.1.1 Linhagens de *Escherichia coli*

Foram utilizadas as linhagens DH5 α e XL1 Blue (Tabela 3), derivadas de *E. coli* K12, como hospedeiros do vetor pUC18 (confere resistência a ampicilina; VIEIRA & MESSING, 1982) ou dos plasmídeos recombinantes dele derivados.

Tabela 3 - Linhagens bacterianas utilizadas e seus genótipos.

Linhagens de <i>E. coli</i>	Genótipo	Referência
DH5 α	<i>supE44, Δlac169, (Φ80 lacZΔM15), hsdR17 recA endA1, gyrA96, thi-1 relA1.</i>	HANAHAM (1983)
XL1 Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac⁻</i>	SAMBROOK & RUSSEL(2001).

As linhagens bacterianas foram mantidas segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.1.2 Isolados de *Metarhizium anisopliae*

O fungo filamentosamente entomopatogênico *M. anisopliae* var. *anisopliae* (METSCH) SORAKIN isolado E₆, oriunda de *Deios flavopicta* (Homoptera, Cercopidea) no Espírito Santo, gentilmente cedida pelo professor João Lúcio de Azevedo (Coleção da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz - ESALQ - USP), foi a principal cepa utilizada para a realização deste trabalho. Segundo FRAZZON e colaboradores (2000) esta é a linhagem mais virulenta para o carrapato bovino *Boophilus microplus*.

3.1.2.1 Suspensão de esporos e manutenção de *M. anisopliae*

A suspensão de esporos de cada linhagem foi semeada em placas de Petri contendo meio M_{Cc} (item 3.2.2.2) e incubada a 30^oC por 3-7 dias, até a esporulação. Os esporos foram suspensos das placas, com o auxílio de uma alça de platina e 10 mL de uma solução de Tween (3.8.1.1). A suspensão obtida foi lavada duas vezes em água destilada autoclavada, os esporos foram recuperados por centrifugação (3000 g por 10 min) e contados em Câmara de Neubauer. Foi testada a presença de contaminantes nas suspensões retirando-se 10 μ l das mesmas e colocando as alíquotas em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio LB líquido

(3.2.1.1). Estes foram incubados em um agitador, a 37⁰C, durante 24 h. As suspensões de esporos foram estocadas a 4⁰C por, no máximo, 15 dias para seu uso em culturas.

3.1.3 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados nos experimentos ou para a construção de novos plasmídeos e suas principais características estão indicados na Tabela 4.

3.1.4 Bancos de DNA

Foram utilizados bancos construídos no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos (CBiot/UFRGS). O banco genômico de *M. anisopliae* foi construído em fago λEMBL4 e banco de cDNA em vetor λZIPLOXTM (GIBCO BRL), oriundos de mRNA extraído de culturas de *M. anisopliae* linhagem E₆ em meio com cutícula de carrapato *B. microplus* (SCHRANK, comunicação pessoal).

3.1.5 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos (Tabela 5), foram sintetizados pelas empresas Bio-Syntesis, Inc. e Invitrogen Brasil Custom Primers – Life Technologies.

A região destacada em azul no oligonucleotídeo xGFP indica o sítio para endonuclease de restrição XbaI.

Tabela 4 - Plasmídeos utilizados.

Plasmídeos	Linhagem hospedeira	Marca de seleção	Referência
pUC18	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	VIEIRA & MESSING (1982)
pBT6	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	ORBACH <i>et al.</i> , (1986)
pMETF (1, 2, 3 e 4)	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	BARATTO (2001)
pUCF1 pUCF2 pUCF3 pUCF4	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	BARATTO (2001)
pANChit1	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	BARATTO (2001)
pANsGFP	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	FERNÁNDEZ-ÁBALOS <i>et al</i> (1998)
pANBAR	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	STAATS, 2003
pTEFGFPB	DH5α ou XL1 Blue	Amp ^r	L. Nakazato, comunicação pessoal

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados.

<i>Primers</i>	<i>Orientação</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Seqüência</i>
PUC/M13F	universal- direta	17 nt	5' - GTTTTCCAGTCACGAC - 3'
#panR	reversa	23 nt	5' - TCCAGATTCGTCAAGCTGTTTGA -
#chit1F	direta	20 nt	5' - GCTGTCTACTTCACCAATTG - 3'
#chit1R	reversa	18 nt	5' - CCACGTCCACCCTCCAAT - 3'
#chi2F	direta	20 nt	5' - GTGTTGGCCTTGTGGCCTG - 3'
#chi2R	reversa	20 nt	5' - TACTGGCCAATTTGCTCGGC - 3'
#chi2IR	reversa	18 nt	5' - GAATTGGGTTGGCAGTAC - 3'
#tef1F	direta	20 nt	5' CTTCAAGTACGCTGGGTTC 3'
#tef1R	reversa	20 nt	5' CACATAGGCTTGGAGGGAAC 3'
#xGFP	direta	21 nt	5' - TCTAGATGGTGAGCAAGGGCG - 3'

3.2 Meios de cultura

Os meios sólidos foram adicionados de 1,5% de ágar (p/v) e vertidos em placas de Petri (20 mL/placa). Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120psi por 20 min.

3.2.1 Meios de cultura para *E. coli*

3.2.1.1 Meio de LB (Luria-Bertani)

Composição: 1 % de triptona; 5 % de extrato de levedura; 1 % de NaCl (p/v). O pH foi ajustado para 7,0 com HCl 1M (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.2.1.2 Meio SOC

Composição: 1% triptona; 5% extrato de levedura; 1% NaCl e glicose 20 mM (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.2.2 Meios de cultura para *M. anisopliae*

3.2.2.1 Meio de Cove (MC)

Composição: 1% de glicose; 0,6% de nitrato de sódio. O pH foi ajustado para 6,0, utilizando NaOH 10 M; a seguir o meio de cultura foi esterilizado em autoclave.

3.2.2.2 Meio de Cove Completo (MCc)

Composição: 1% de glicose; 0,6% de nitrato de sódio; 0,15% de caseína hidrolisada; 0,05% de extrato de levedura; 0,2% de peptona (p/v). O pH foi ajustado para 6,0 utilizando NaOH 10 M; a seguir o meio de cultura foi esterilizado em autoclave.

3.2.2.3 Meio Mínimo (MM)

Composição: 0,1% de KH_2PO_4 (p/v); 0,05% de MgSO_4 . Uma solução estoque de MgSO_4 5% foi previamente preparada, autoclavada e adicionada assepticamente ao meio.

Nos meios de cultura foram adicionados, assepticamente, 2% de Solução de Sais (v/v; item 3.8.1.2) e 0,04% de solução de elementos traços (v/v; 3.8.1.3).

3.3 Cultivo dos microrganismos

3.3.1 Cultivo de *E.coli* em meio líquido

A bactéria *E. coli* foi cultivada em frascos de *Erlenmeyer* de 500 mL de capacidade contendo 100 mL de meio LB, para extração de plasmídeo em grande escala, ou em tubos de ensaio contendo 3 mL, para minipreparação, a 37⁰C e em agitação de 200 rpm O/N (16h). Os cultivos foram acrescidos de ampicilina, numa concentração final de 100µg/mL.

3.3.2 Cultivo de *M. anisopliae* em meio líquido

O volume ocupado pelo meio de cultura foi sempre de, no máximo, 20% da capacidade total do frasco com capacidade para 500 mL e o inóculo da ordem de 1-5 x 10⁶ esporos.mL⁻¹. A cultura foi incubada sob agitação de 100 a 150 rpm, à 28⁰C durante os tempos necessários aos experimentos.

3.3.2.1 Cultivo de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono

M. anisopliae foi cultivado conforme condições definidas para cada experimento. Os micélios para produção de protoplastos ou para extração de DNA foram cultivados em MCc, durante 16h e 48h, respectivamente. Para extração de RNA, foram cultivados em MM acrescidos das seguintes fontes de carbono: glicose 1%; N-acetilglicosamina (NAcGlc) 0,1% ; quitina cristalina (SIGMA) 0,8 % ou cutícula de carrapato *B. microplus* 1% (preparada como descrito no item 3.3.2.2), durante os seguintes tempos: 18 h, 30 h, 48 h e 72 h. As culturas que tinham glicose 1% como fonte de carbono foram suplementadas a cada 24 h com uma solução de glicose (3.8.1.4). Após a incubação, os micélios foram filtrados em papéis filtro (WHATMAN N°1), secos e guardados a menos 80⁰C, quando necessário. Os sobrenadantes

foram liofilizados e concentrados 5 vezes para a realização dos ensaios enzimáticos e análise em gel de atividade.

3.3.2.2 Preparação de cutícula de *B. microplus*

A cutícula utilizada nos experimentos foi obtida a partir de teleóginas ingurgitadas do carrapato *B. microplus*. 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, a 120°C, durante 15 min, e armazenadas à 4°C.

3.4 Enzimas e antibióticos

3.4.1 Enzimas

As enzimas de restrição, fosfatase alcalina, DNA-polimerase High Fidelity, DNA-polimerase I (Klenow), Taq DNA-polimerase, transcriptase reversa M⁻MLV e DNA-ligase de T4 e seus respectivos tampões tiveram por origem CenBiot^{enzimas} (Centro de Biotecnologia da UFRGS), Amersham Biosciences, Biological Research Products-Promega, MBI Fermentas, Invitrogen (Life Technologies) ou United States Biochemical Corporation-USB.

3.4.1.2 RNase A

A solução de RNase A foi preparada e utilizada segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.4.1.2 DNase A

A solução de DNase A foi preparada e utilizada segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.4.2 Antibióticos e antifúngicos

3.4.2.1 Ampicilina

Solução estoque de ampicilina de 50 mg/ml (Sigma) foi preparada e utilizada segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.4.2.2 Glifosinato de amônia (GA)

Solução estoque de GA de 40mg/ml foi preparada e utilizada segundo STAATS (2003).

3.5 Manipulação de DNA

3.5.1 Extração de plasmídeos

3.5.1.1 Minipreparação – lise alcalina

As bactérias, depois de cultivadas, foram coletadas por centrifugação a 14000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi desprezado; o pellet foi ressuspensão em 300 µl da Solução I (item 3.8.2.1), foram acrescentados 300 µL da Solução II (3.8.2.2) e deixado 5 min a temperatura ambiente, foram acrescentados 300 µL da Solução III (3.8.2.3) e incubado 10 min no gelo; após foi centrifugado a 14000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Foram acrescentados 10µL de RNase A (1mg/mL) e incubado por 20 min à 37⁰C. A preparação foi extraída uma vez com fenol tamponado (3.8.3.2) e uma vez com clorofórmio : álcool isoamílico (3.8.3.4) centrifugando por 10 min a 14000 rpm a cada extração. A fase aquosa foi coletada e o DNA foi precipitado com 600 µL de isopropanol (Sigma) e deixado 30 min a temperatura ambiente. Após centrifugação por 10 min a 14000 rpm o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com etanol 70% (Sigma) e deixado secar por 30 min a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em 60 µl de TE (3.8.3.9) apresentando um rendimento de 100 ng/µL.

3.5.1.2 Extração de plasmídeos em grande escala

As bactérias transformadas foram cultivadas em 100 mL de LB líquido O/N a 37⁰C. As extrações de plasmídeos foram realizadas utilizando o kit de purificação "Concert Rapid Plasmid Maxiprep System" da GIBCO-BRL. Foram seguidas as recomendações do fabricante. A extração apresentou um rendimento de 1 µg/µl em 200 µl.

3.5.2 Extração de DNA genômico de *Metarhizium anisopliae*

Para a extração de DNA genômico de *M. anisopliae*, o micélio do fungo foi cultivado em meio MCc líquido. Depois de filtrado e lavado com água, o micélio foi pulverizado em gral com nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino. O pó foi transferido para um tubo e acrescentaram-se 10 mL de TEX por g de micélio (item 3.8.3.1) e misturou-se até a completa

homogeneização, com o auxílio de uma pipeta *Pausteur*. Após 15 min de incubação a 70°C, foi procedida a extração com 1 volume de fenol hidratado (3.8.3.2) e centrifugou-se a 10.000 rpm durante 15 min. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e foi procedida a extração com 1 volume de fenol-clorofórmio (3.8.3.3) e centrifugou-se novamente a 10.000 rpm durante 15 min. Coletou-se a fase aquosa e foi procedida a extração com 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (3.8.3.4). Após, procedeu-se uma nova centrifugação (10.000 rpm, 15 min). A fase aquosa foi coletada e o DNA foi precipitado com adição de NaCl 200mM e 2 volumes de etanol absoluto a -20°C, mantida durante duas horas a -20°C. O DNA foi coletado por centrifugação (10.000 rpm, 20 minutos), seco e ressuspense em 200µL de tampão TE (3.8.3.9). Sua concentração foi estimada em espectrofotômetro A_{260/280} (Ultraspec 2000 - UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech), e com o auxílio de um marcador de tamanho de fragmentos de DNA, λHindIII, após eletroforese em gel de agarose (item 3.5.4.2). A técnica apresentou um rendimento de 50 µg.

3.5.3 Extração de RNA de *M. anisopliae*

Para a extração de RNA total de *M. anisopliae*, esporos do fungo foram inoculados em meio MCc líquido e incubado nas condições e tempos determinados (item 3.3.2.1). O micélio, coletado por filtração, foi macerado em nitrogênio líquido e transferido rapidamente para tubos *ependorfs* previamente preenchidos com 0,75mL de tampão de lise (3.8.3.5) e 0,3mL de fenol tamponado (3.8.3.2). A mistura foi levemente agitada por 10 min e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm em microcentrifuga. A fase aquosa foi extraída com 0,5 volume de fenol tamponado e 0,5 volume de clorofórmio, sendo então centrifugada em microcentrifuga (10.000 rpm por 10 min). A fase aquosa foi novamente transferida e foi adicionado 0,75 volume de cloreto de lítio aos tubos armazenados a 4°C durante 18 horas, período após o qual efetuou-se mais uma centrifugação (10.000 rpm por 10 min). O conteúdo dos ácidos nucleicos sedimentados foi suspenso em 0,3mL de água DEPC estéril (3.8.3.7), 0,03mL de acetato de sódio e 0,75mL de etanol absoluto e precipitado por 2 h a -70°C. O material foi coletado por centrifugação (10.000 rpm por 10 min), lavado com etanol 70%, seco e suspenso em 30µL de água DEPC. A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro A_{260/280} e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. A técnica apresentou um rendimento de 200 µg.

3.5.4 Clivagem e análise de DNA por eletroforese

3.5.4.1 Clivagem de DNA com endonucleases de restrição

As reações de clivagem de DNA genômico ou plasmidiais foram realizadas utilizando-se o tampão adequado à melhor eficiência para clivagem de cada enzima, conforme recomendações dos fabricantes. Quando foram necessárias clivagens com mais de uma enzima, com diferentes tampões de reação, primeiramente, foi procedida a clivagem com a enzima que exigia tampão de reação com menor força iônica. Foi corrigida a concentração dos componentes do tampão de reação e então procedida a segunda clivagem. Caso não fosse possível a correção, após a primeira reação de clivagem, o DNA era precipitado com etanol, ressuspensão, no tampão de reação da segunda enzima e procedia-se a reação. Usualmente, foram utilizados 1-3 U/ μg de DNA. As reações foram incubadas a 37⁰C por 1 h e a enzima foi inativada por 10 min a 70⁰C, ou nas temperaturas recomendadas pelos fabricantes. O produto das reações foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

3.5.4.2 Eletroforese de DNA ou RNA em gel de agarose

Foi utilizado o sistema de eletroforese horizontal com gel submerso, sendo o preparo dos géis realizado como descrito em SAMBROOK & RUSSEL (2001).

A agarose, na concentração de 0,8 a 1,5%, foi fundida em TAE 1x (item 3.8.4.1), adicionando brometo de etídio (3.8.4.2), para a concentração final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1x (3.8.4.1). Foi adicionado ao DNA, a ser analisado, tampão de amostra (3.8.4.3) numa concentração final de 1x. 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).

3.5.5 Purificação e ligação de DNA

3.5.5.1 Purificação de fragmentos de DNA de géis de agarose

Os fragmentos de DNA foram fracionados por eletroforese em gel de agarose e as regiões contendo os fragmentos desejados foram cortadas do gel com auxílio de bisturi. Os fragmentos de DNA foram purificados dos géis de agarose utilizando o kit de purificação por eluição "Concert Rapid Gel Extraction Systems" da GIBCO BRL. Foram seguidas as recomendações do fabricante. O kit apresentou a capacidade de recuperação de 60% do DNA inicial.

3.5.5.2 Ligação de DNA

As reações de ligação de DNA foram procedidas utilizando-se uma proporção molar vetor:fragmento de 1:2 a 1:5. O volume final das reações foi de 10-20 μ l e incluindo tampão de ligação em uma concentração final de 1x e 3 U de T4 DNA Ligase. As reações foram incubadas a 16⁰C por 14-16 h.

3.5.6 Transferência de DNA para membrana de náilon

3.5.6.1 Transferência de DNA para análise por *Southern*

Os DNAs fracionados por eletroforese em gel de agarose (3.8.4), foram transferidos para a membrana de náilon HybondTM-N⁺ (Amersham Biosciences) segundo o manual de instruções do sistema de transferência de DNA *VacuGeneTMXL* (Pharmacia Biotech).

3.5.6.2 Transferência de DNA de colônias de *E. coli* para hibridização

As colônias foram transferidas com palitos estéreis para placas com meio LB sólido de forma orientada e incubadas a 37⁰C durante 16 h. Membranas de náilon (Amersham Biosciences) foram cortadas no tamanho das placas e colocadas sobre estas durante 2 min. Após este tempo, as membranas foram colocadas em solução de desnaturação (3.8.5.1) durante 2-5 min. A seguir as membranas foram colocadas em solução de lavagem (3.8.5.3) por 1 min até as células bacterianas se soltarem da membrana. O procedimento foi de acordo com o sugerido pelo manual de instruções do kit ECL (Amersham Biosciences). A fixação do DNA transferido às membranas de náilon foi à 80⁰C durante 2 h.

3.5.7 Hibridizações de DNA genômico (*Southern*) e de colônias

3.5.7.1 Detecção de hibridização por método não radioativo

As hibridizações, pelo método não radioativo, foram realizadas de acordo com o manual de instruções do kit ECL (Amersham Biosciences). Este é um método que possui sistema direto de marcação de ácidos nucléicos, lavagens (3.8.6.1 e 3.8.6.2) e sistema de detecção. Após, as membranas foram expostas a filmes de auto-radiografia (Kodak X-Omatic) durante 10 - 60 min.

3.5.7.2 Detecção de hibridização por método radioativo

As membranas de náilon foram pré-hibridizadas durante 3h (item 3.8.7.1). Em seguida, foram hibridizadas, durante 16h a 60⁰C, com sondas marcadas por fósforo radioativo (α -³²dCTP - Amersham Biosciences). Para a marcação foi utilizado o método de *random primer* (RediprimeTM II – Random Prime Labelling System - Amersham Biosciences),

seguindo instruções do kit. As lavagens foram adequadas para cada reação de hibridização, utilizando as soluções de lavagens (itens 3.8.7.3, 3.8.7.4 e 3.8.7.5), por 15 min, segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001). As membranas foram expostas a filmes de auto-radiografia (Kodak X-Omatic) durante 1-2 dias.

3.5.8 Construção do banco subgenômico de *M. anisopliae*

Um banco subgenômico com fragmentos de DNA genômico de aproximadamente 5,5 kb, obtido após a digestão com a enzima de restrição PstI, foi construído de acordo com SAMBROOK & RUSSEL (2001) no vetor pUC18 digerido com a mesma enzima. O produto da reação de ligação foi transformado em *E. coli* e os clones selecionados por hibridização de colônias(3.5.7). O clone que demonstrou ser positivo teve seu inserto tratado com a enzima de restrição Sall, os fragmentos obtidos foram clonados em pUC18, após tratamento com a mesma enzima, para facilitar seu seqüenciamento (5.5.12).

3.5.9 Amplificação de DNA (PCR; *polymerase chain reaction*)

As amplificações foram realizadas conforme as condições para as reações especificadas na Tabela 6. As reações foram efetuadas em termociclador PTC 200 (MJ Research). Para a otimizar e o ajustar cada reação, foram alteradas a temperatura de anelamento (40-65⁰C) e a concentração do MgCl₂ (1,5 ou 2,5 mM), do tampão de reação para a *Taq* DNA-polimerase (CenBiot^{enzimas} - Centro de Biotecnologia da UFRGS) e DNA-polimerase High Fidelity (Amersham Biosciences).

Tabela 6 - Componentes das reações de amplificação de DNA por PCR.

Componentes	Volume/μl	Concentração
Tampão de reação	2,5	10x
dNTPs	5,0	1 mM
DNA molde	1,0	100 ng/ μ l
# Direta	2,0	50 pmol
# Reversa	2,0	50 pmol
<i>Taq</i> DNA-polimerase	0,5	2,5 U/ μ l
H₂O Mili-Q	12,0	
Final	25	

3.5.9.1 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #Chit1F e #Chit1R (Tabela 5)

Condições: 94⁰C por 5 min, 45⁰C por 40 s, 72⁰C por 30 s, 94⁰C durante 1 min, repetindo a partir do passo dois 22 vezes, 94⁰C por 30 s, 45⁰C por 2 min, 72⁰C por 10 min e 4⁰C por 10 min.

3.5.9.2 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #Chi2F e #Chi2R (Tabela 5)

Condições: 94⁰C por 5 min, 50⁰C por 30 s, 72⁰C 40 s, 94⁰C durante 40 s, repetindo a partir do passo dois 26 vezes, 94⁰C por 30 seg, 50⁰C por 2 min, 72⁰C por 10 min e 4⁰C por 10 min.

3.5.9.3 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #tef1F e #tef1R (Tabela 5)

Condições: 94⁰C por 5 min, 60⁰C por 1 min, 72⁰C por 1 min, 94⁰C durante 1 min, repetindo a partir do passo dois 18 vezes, 94⁰C por 30 s, 55⁰C por 2 min, 72⁰C por 10 min e 4⁰C por 10 min.

3.5.9.4 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #xGFP e #PUC/M13F (Tabela 5)

Condições: 94⁰C por 5 min, 60⁰C por 1 min, 72⁰C por 1 min, 94⁰C durante 1 min, repetindo a partir do passo dois 30 vezes, 94⁰C por 30 s, 60⁰C por 2 min, 72⁰C por 10 min e 4⁰C por 10 min.

3.5.9.5 Reação de amplificação de DNA com os oligonucleotídeos #xGFP e #panR (Tabela 5)

Condições: 94⁰C por 5 min, 55⁰C por 30 s, 72⁰C por 40 s, 94⁰C durante 1 min, repetindo a partir do passo dois 30 vezes, 94⁰C por 30 s, 55⁰C por 2 min, 72⁰C por 10 min e 4⁰C por 10 min.

Para a reação de amplificação do fragmento interno do gene *chi2* (item 3.5.9.2) a concentração de MgCl₂ foi de 1,5 mM, para as demais reações (itens 3.5.9.1, 3.5.9.3, 3.5.9.4 e 3.5.9.5) a concentração de MgCl₂ foi de 2,5 mM.

3.5.10 Amplificação por RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

Os RNAs extraídos de *M. anisopliae* cultivado em diferentes condições depois de quantificados, foram utilizados para síntese da primeira fita do cDNA, utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV, o respectivo tampão e soluções, com oligonucleotídeo poli-T, o

procedimento foi de acordo com o fabricante (Invitrogen - Live Technologies). Após a síntese da primeira fita, 05 a 2,5 µL foram adicionados para a reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para os genes *chit1* e *chi2* (Tabela 5) de acordo com as condições já determinadas (item 3.5.9).

O controle interno foi o gene de *tef1α* (NAKAZATO, comunicação pessoal; número de acesso AY445082), com os oligonucleotídeos #tef1F e #tef1R (Tabela 6; item 3.5.9.3). A reação sem a enzima transcriptase reversa foi usada como controle para cada condição.

3.5.11 Técnica de PCR RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)

Para a amplificação da região 5' do cDNA e região 5' não-traduzida do gene *chi2*, foi realizada uma PCR RACE 5', utilizando o kit 5' RACE (System for Rapid Amplification of cDNA Ends) Version 2.0 (Invitrogen, Live Technologies). No experimento foram utilizados RNAs de *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com quitina em cultivo 48 h e os oligonucleotídeos específicos para o gene *chi2*, #chi2R e #chi2IR (Tabela 5), sendo seguidas as recomendações do fabricante. O produto obtido foi purificado e seqüenciado (5.5.12).

5.5.12 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer*, armado com capilares de 50cm e polímero POP6 (Applied Biosystems) e no Laboratório da Rede Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural (PIGS, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o seqüenciador Megabace1000, kit Dye terminator. A quantidade de DNA molde utilizado para o seqüenciamento foi de 50 a 300 ng, de acordo com as otimizações para cada seqüenciador. A qualidade das bases obtidas foi avaliada pelo programa Phred Phap antes das mesmas serem comparadas com o GenBank usando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997; NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.5.13 Comparação e análise das seqüências de nucleotídeo e aminoácidos

Para comparação de seqüências de nucleotídeos e os alinhamentos múltiplos das seqüências deduzidas de resíduos de aminoácidos e edição foram utilizados os programas ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997; <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>), BioEdit (HALL, 1999) e GENEDOC (NICHOLAS *et al.*, 1997). Para a produção de árvore filogenética foi utilizado o programa Mega 2.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis,

version 2.1; KUMAR *et al.*, 2001). Para a análise de sítio de clivagem para a identificação de peptídeo-sinal em seqüência de aminoácido, foi utilizando o programa SIGNALSCAN (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>).

3.6 Transformação de *E. coli* e *M. anisopliae*

3.6.1 Eletroporação de bactérias

Para o preparo de células eletrocompetentes e sua transformação, seguiram-se os protocolos descritos por DOWER (1988) e SMITH *et al.* (1990).

Um microlitro de reação de ligação ou plasmídeo a ser transfectado foi misturado com 40 µl de células competentes da bactéria *E. coli*, incubados por 20 min no gelo, eletroporadas, inoculadas em meio SOC e incubadas por 1 h a 37°C. Duzentos microlitros de células foram espalhados em meio LB sólido, contendo ampicilina (100 ng/mL) e foram incubados a 37°C O/N. Ao meio foram adicionados X-gal e IPTG, segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001), visualizando-se assim as colônias brancas correspondentes às positivas. Estas colônias foram isoladas e cultivadas, e foi procedida a extração de plasmídeos (3.5.1.2). A presença do fragmento clonado foi confirmada por clivagens (3.5.4.1) e o posterior seqüenciamento (5.5.12) utilizando *primers* (Tabela 5) que anelam nas regiões flanqueadoras no vetor clonado.

3.6.2 Protoplastização

A produção de protoplastos foi segundo GOETHEL *et al.* (1990). Após os protoplastos foram contados em Câmara de Neubauer.

3.6.3 Transformação de *M. anisopliae*

As transformações foram realizadas utilizando polietilenoglicol (PEG; BOGO *et al.*, 1996). A suspensão de protoplastos (item 3.6.2.1), diluída em 200 µL de TM (item 3.8.8.2), para a concentração final de 2×10^7 , foi adicionado 50 µg de DNA plasmidial (3.5.1.2), ressuspenso em 100 µL de TM e incubado por 30 min em gelo. Após foi adicionado 33 µL de PEG (3.8.8.1), misturado suavemente e incubado no gelo por 10 min. Em seguida, foram adicionados 666 µL de PEG, misturado suavemente girando o tubo e incubado por 10 min, a temperatura ambiente. A regeneração foi realizada em meio RM incubando a 28°C por 24 h. Após este período a transformação foi misturada a 100 mL do meio de seleção (MC, 4% de Agar, mais glifosinato de amônio, 100 µg por mL), vertido em placa de Petri. O cultivo foi

durante 21 dias até o aparecimento de transformante resistentes, que tiveram sua estabilidade avaliada por repiques sucessivos em meio não-seletivo.

3.7 Análise de expressão de quitinase ou de GFP nos transformantes

3.7.1 Visualização da expressão de GFP pelos transformantes de *M. anisopliae* para análise de promotores

Os transformantes de *M. anisopliae* cultivados nas diferentes condições e diferentes tempos foram analisados por microscopia de fluorescência em microscópio de epifluorescência em filtros de 450-490 nm de emissão e 510 nm de absorção (Axiolab – Carl Zeiss).

3.7.2 Ensaio enzimático para detecção de quitinase

Para determinar a atividade enzimática de quitinase de sobrenadantes de cultivos de transformantes de *M. anisopliae* foi utilizada quitina coloidal como substrato em uma modificação do método descrito por REISSING e colaboradores (1955). As reações continham 300 µl da amostra (item 3.3.2.1), 300 µl do substrato e 300 µl de tampão de acetato (50 mM; 3.8.9.2). As reações foram incubadas a 37⁰C durante 1 h, sob agitação branda. A reação foi centrifugada brandamente e deste foram retirados 170 µl, no qual, adicionou-se 30 µl de ácido bórico (3.8.9.2). Então, a mistura foi incubada a 100⁰C por 3 min e resfriada imediatamente em gelo. Posteriormente foi adicionado 1,0 ml de solução DMAB (*p*-Dimetilaminobenzaldeído; 3.8.9.3). A mistura foi incubada a 37⁰C por 10 min para desenvolvimento e estabilização da coloração. As reações foram quantificadas por medida em espectrofotômetro a A_{585 nm}. Para cada experimento foram adicionados os seguintes controles: branco da reação (sem substrato); branco total (reação contendo tampão e água) e branco do substrato (sem amostra).

Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de NAcGlc por min por ml a 37⁰C. A atividade específica é a quantidade de quitinase, em U, em relação à quantidade de proteína total, em mg. A quantificação de proteínas total foi efetuada pelo método de BRADFORD, (1976), usando BSA como padrão.

3.8 Soluções e tampões

As soluções foram preparadas com água bidestilada ou Milli-Q autoclavada, seguindo preferencialmente as recomendações de SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.8.1 Solução para suspensão de esporos e cultivos de *M. anisopliae*

3.8.1.1 Tween

- Tween 80 0,01 %

3.8.1.2 Solução de Sais

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

3.8.1.3 Solução Elementos Traços

- Na₂B₄O₇.7H₂O 0,004%
- CuSO₄.5H₂O 0,04%
- FeSO₄ 0,001%
- Na₂MNO₄.2H₂O 0,08%
- MnSO₄.2H₂O 0,08%
- ZnSO₄.7H₂O 0,08% (p/v)

As soluções foram preparadas e autoclavadas separadamente e utilizadas como estoques.

3.8.1.4 Solução de glicose

- Glicose 20%

A solução foi filtrada assepticamente e armazenada à 4^oC.

3.8.2 Soluções para extração de plasmídeos (minipreparação)

3.8.2.1 Solução I

- Glicose 50 mM
- Tris.HCl 25 mM pH 8,0
- EDTA 10 mM pH 8,0

3.8.2.2 Solução II

- NaOH 0,2 M
- SDS 1%

Preparada na hora do uso.

3.8.2.3 Solução III

- Acetato de potássio 3 M
- Ácido acético glacial 11,5 ml em 100 ml

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

3.8.3.1 Tampão de extração (TEX)

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

3.8.3.2 Fenol hidratado e tamponado

- H₂O
- Tris-HCl 100mM pH 8,0

3.8.3.3 Fenol-clorofórmio

- Fenol : clorofórmio (1 : 1, v/v).

3.8.3.4 Clorofórmio-álcool isoamílico

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

3.8.3.5 Tampão de lise

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

3.8.3.6 Cloreto de lítio

- LiCl 8 M

3.8.3.7 Água DEPC

- 0,01% de dietilpirocarbonato

3.8.3.8 Solução de acetato de sódio

- NaAc 3M pH 5,2

3.8.3.9 TE

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

3.8.4 Soluções e tampões para análise de ácidos nucleicos

3.8.4.1 TAE 1x (pH 8,2)

- Tris-acetato 40 mM
- EDTA 1 mM

A solução estoque era de TAE 50x, diluída para uso.

3.8.4.2 Solução de brometo de etídio

- EtBr 1mg/mL (p/v)

3.8.4.3 Tampão de amostra para gel de agarose

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

Para as migrações de DNA ou RNA nos géis de agarose foram utilizadas as fontes Power PAC (Bio Rad), utilizando 2-5 V/cm.

3.8.5 Tampões e soluções para transferência de DNA, segundo o manual de instruções do kit ECL (Amersham Biosciences)

3.8.5.1 Solução de desnaturação

- NaCl 1,5 M
- NaOH 0,5 M

3.8.5.2 Solução de neutralização

- NaCl 1,5 M

- Tris.HCl 0,5 M

O pH foi ajustado para 7,5.

3.8.5.3 Solução de lavagem

- SSC 5x

3.8.5.4 SSC 20x

- Citrato de sódio dihidratado 0,3 M
- NaCl 3 M

O pH foi ajustado para 7,0.

3.8.6 Tampões e soluções para hibridização não-radioativa, segundo o manual de instruções do kit ECL (Amersham Biosciences)

3.8.6.1 Tampão primário de lavagem com uréia

- Uréia 6 M
- SSC 0,5x
- SDS 0,4%

Esta solução foi mantida até 3 meses a 4⁰C. Sua extringência foi aumentada, quando necessário, diminuindo-se a concentração de SSC.

3.8.6.2 Tampão secundário de lavagem

- SSC 2x

3.8.7 Tampões e soluções para a hibridização radioativa (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)

3.8.7.1 Tampão de pré-hibridização e hibridização

- SSC 5x
- Denhardt 5x
- SDS 0,1%

3.8.7.2 Denhardt 50x

- Ficoll 400.000 0,02%
- Polivinilpirrolidona 0,02%
- BSA 0,02

3.8.7.3 Solução de lavagem primária

- Denhardt 5x
- SSC 5x
- SDS 0,1%

3.8.7.4 Solução de lavagem secundária

- SSC 4x
- SDS 0,1%

3.8.7.5 Solução de lavagem terciária

- SSC 2x
- SDS 0,1%

As lavagens foram realizadas durante 15 min a 45⁰C A extringência de cada lavagem foi adequada conforme a necessidade.

3.8.8 Tampões e soluções para transformação de *M. anisopliae*

3.8.8.1 PEG

- PEG3000 60% em TM

3.8.8.2 Meio de transformação (TM)

- Sorbitol 1 M
- Tris.HCl 10mM pH 7,5
- CaCl₂ 20 mM

3.8.8.3 Meio de regeneração (RM)

- Sorbitol 1.2 M
- Tris.HCl 10mM pH 7.5
- K₂PO₄ 0,1%
- MgSO₄ 0,05%
- NaNO₃ 0,3%
- Glicose 2%

3.8.9 Tampões e soluções para ensaios enzimáticos

3.8.9.1 Tampão acetato

- Acetato de sódio 50 mM pH 5.6
- HCl

3.8.9.2 Solução de ácido bórico

- Ácido bórico 0,8 mM pH 9,1

3.8.9.3 Solução DMAB (*p*-Dimetilaminobenzaldeído)

- DMAB 1 g
- Ácido acético glacial 100 ml
- HCl 1%

Em volume final de 1000 ml.

4 – RESULTADOS

4.1 Isolamento e caracterização do gene *chi2* de *M. anisopliae* isolado E₆

Com o objetivo de isolar o gene *chi2* foi realizado um *screening* em aproximadamente 80.000 clones de um banco genômico e 100.000 clones 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 (Augusto Schrank, comunicação pessoal). Utilizamos como sonda um fragmento de DNA de 615 pb obtido por amplificação de uma seqüência interna do gene *chi2*, utilizando oligonucleotídeos projetados com base na seqüência parcial do ortólogo isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* (Genbank AJ293217) e como molde utilizamos DNA genômico de *M. anisopliae* E₆. Este fragmento foi seqüenciado e demonstrou uma identidade de mais de 90% com a seqüência correspondente do gene *chi2* da var. *acridum*, além da seqüência de um íntron de 210 pb (Figura 08). A localização deste fragmento é destacada na seqüência completa do gene (Figura 12). Nenhum clone positivo pode ser obtido.

Para comprovar a presença do gene *chi2* no genoma de *M. anisopliae* E₆ e utilizar como suporte para experimentos posteriores, foi realizado um experimento de hibridização (item 3.5.7) com DNA genômico do fungo digerido com diferentes enzimas de restrição (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI e XbaI). A sonda utilizada foi o amplicon de 615 pb gerado com os oligonucleotídeos do gene *chi2*. A Figura 09 mostra o padrão de hibridização obtido. O resultado de uma única banda de hibridização indica que o gene *chi2* está presente e está em cópia única no genoma de *M. anisopliae* E₆.

Alternativamente, para o isolamento da seqüência genômica do gene *chi2*, foi construído um banco subgenômico (item 3.5.8), utilizando o vetor pUC18. A região no gel de agarose, equivalente a região de hibridização com o DNA genômico obtida a partir do tratamento com a enzima de restrição PstI (Figura 09, canaleta 5), que compreende fragmentos de aproximadamente 5,0 kb foi purificada (item 3.5.5), uma porção foi checada por PCR para confirmar a presença do inserto (3.5.9.2) e utilizada na construção do banco. Um clone contendo um inserto de 5,3 kb foi isolado por *screening* de colônias, utilizando o amplicon de 615 pb do gene *chi2* como sonda. O inserto de 5,3 kb presente no clone foi mapeado com enzimas de restrição (Figura 10, painel A) e um mapa físico está mostrado na Figura 10 (painel B). Este inserto foi digerido com a enzima de restrição SallI e os produtos de

aproximadamente 500 pb, 1,8 kb, 1,25 kb e 1,3 kb, foram subclonados no vetor pUC18. Foi realizado o seqüenciamento de cada um dos fragmentos de DNA clonados (item 3.1.5), permitindo a determinação da seqüência do gene *chi2* com confiabilidade (Figura 12).

```

chi2 Ac: GGTGTTGGCCTTGTGGCCTGGCGTCCGGAGTGCCCTTCACTGACAACATATCAATCAAG 60
chi2 E6: GCGTCGGCCTTGCTGGTCTGGCGGCCGGGGTGCCCTTGACTGACAAGATATCAGTCAAG 60

chi2 Ac: CCACGACAAGCACCCGGAGCGCAAAACATCGTCTACTGGGGACAAAATGGCGGTGGTACC 120
chi2 E6: CCACGACAAGCACCCGGAGCGCAAAATGTCGTCTACTGGGGGCAGAACGGCGGCGGTACC 120

chi2 Ac: ATCGAGAATAACGACCTCGCGGCGTACTGCCAACCCAATTCGGAATCGACGTTTTGGTT 180
chi2 E6: ATCGAAAATAACGACCTCGCGGCGTATGCCAGCCAATTCGGAATCGACGTTTTGGTT 180

chi2 Ac: CTTGCATTTCTCTATCAATTTGGAAATGGCGGCAACATACCTTCAGGCACTATAG----- 240
chi2 E6: CTTGCATTTCACTATCAATTTGGAAATGGCGGCAACATACCTTCAGGCACTATAGGTCAG 240

chi2 Ac: ----- 241
chi2 E6: TTTTTTTTTTATTTTTATTTTCTATTTTACGTTTTAAATTTATTACTCTCATGGAAGCCG 300

chi2 Ac: ----- 360
chi2 E6: AGAGCGTATGGAGAGGCTACGTATCTATCTATACATGTATAGAAATACGCCGCATCTCGT 360

chi2 Ac: ----- 420
chi2 E6: AGGCAGCAGGCTACTCCCCTGACCAGCTTTTCTATTCATTTTCCCTTCCCTTGTTTTCTA 420

chi2 Ac: -----GTCAGTCATGCTACATCAGCACGTCGGCCAGGGC 270
chi2 E6: ATGTCGGAGTTCTAACCTCATAACAGGTCAGTCATGCTACATCAGCACGTCGGCCAGGGT 480

chi2 Ac: CAGAACTGCGAAGCCTTGACCGCGGCCATACAAACTTGCCAGTCTGCCGGTGTCAAGATC 330
chi2 E6: CAAAACCTGCGAAGCCTCACCCGACGCCATACACACTGCCAGTCCGCCGGTGTCAAGATC 540

chi2 Ac: ATCTTGTCCTCGGCGGTGCGACGAGCTCTTATTCCTCCAGACGCAGGCGCAGGCCGAG 390
chi2 E6: GTCTTGTCCTCGGCGGTGCGACGAGCTCTTATTCCTCCAAACGCAGGCGCAAGGCCGAG 600

chi2 Ac: CAAATTGGCCAGTAC 415
chi2 E6: CAAATAGGCCAGTAC 615

```

Figura 08 - Comparação entre a seqüência do amplicon correspondente ao gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* com a seqüência correspondente da var. *acridum* (AJ293217).

Foi analisada comparativamente a seqüência gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *acridum* (*chi2* Ac) com o fragmento amplificado do seu ortólogo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₆ (*chi2* E6). Os nucleotídeos sombreados com cinza representam diferenças entre as seqüências. Os traços foram introduzidos para maximizar o alinhamento. Os números à direita indicam o número de nucleotídeos das seqüências. Em itálico e sombreado está destacada a seqüência correspondente a um íntron de 210 pb, no amplicon da linhagem E₆ de *M. anisopliae*.

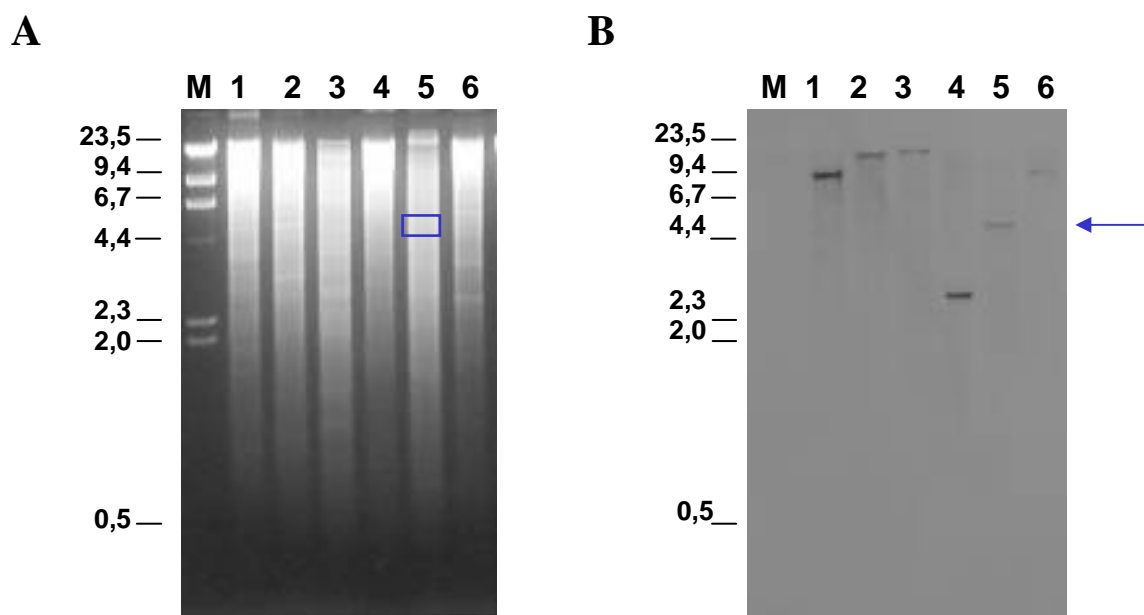
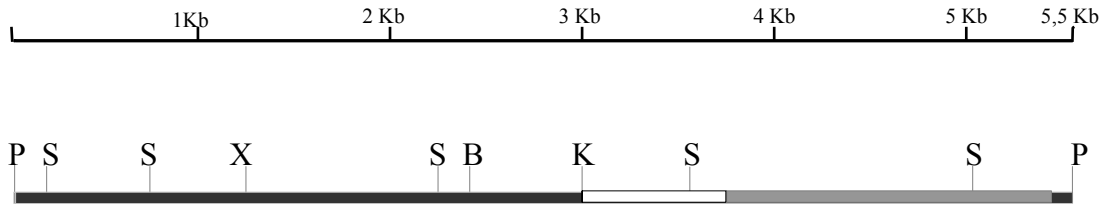


Figura 09 – Análise do gene *chi2* no genoma de *M. anisopliae* linhagem E₆.

Painel A, eletroforese em gel de agarose 0,8%. **Painel B**, Auto-radiografia da membrana hibridizada. Foi utilizado como sonda o amplicon de 615 pb gerado com os oligonucleotídeos do gene *chi2*. Canaletas: (M) marcador de tamanho molecular Lambda / HindIII, número indicado à esquerda em kb; DNA Genômico de *M. anisopliae* E₆ digerido com: (1) BamHI; (2) EcoRI; (3) HindIII; (4) KpnI; (5) PstI e (6) XbaI. A seta indica a região de hibridização da sonda e o quadrado em azul indica a região de migração do DNA genômico digerido e purificado para a construção do banco enriquecido. Estes fragmentos apresentam aproximadamente 5 kb.

A



B

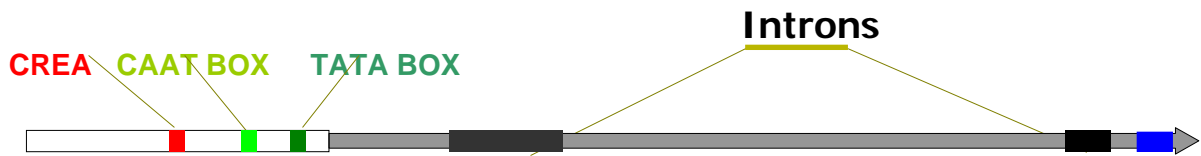


Figura 10 - Representação esquemática do gene *chi2*.

Painel A - Mapa físico do gene *chi2*. A barra em preto representa tamanho em kb. Abaixo está representada a distribuição dos principais sítios de restrição presentes no clone, barra sem preenchimento representa a provável região regulatória e em cinza a região codante do gene. Os sítios de restrição são: P- PstI, S-Sall, X-XbaI, B-BamHI, K-KpnI. **Painel B** - Representação mais detalhada do gene *chi2*, mostrando: a região flangeadora 5', barra sem preenchimento, a ORF do gene, barra em cinza, e a distribuição de seus dois íntrons, barras em preto. Em vermelho está representado o provável elemento CREA, em verde claro o provável elemento CAAT Box e em verde escuro o provável elemento TATA Box. Em azul está representada a região flangeadora 3'.

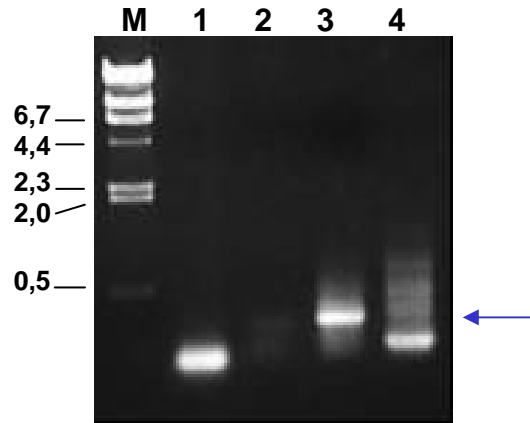
A seqüência de cDNA do ortólogo do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *acridum* disponível, apesar de conter 1.437 pb, não apresenta a porção N-terminal da quitinase nem a região 5' não traduzida (FREIMOSER *et al.*, 2003, Genbank AJ293217). A simples análise da seqüência do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₆ aqui isolada não permitiu a determinação, com precisão, do provável sítio de início de tradução. A região flanqueadora 5' do gene *chi2* não apresenta identidade com outros genes para quitinases e apresenta poucos elementos reguladores reconhecíveis *in silico*. Para determinar experimentalmente a região 5' não traduzida do gene, foram realizadas reações de PCR RACE 5' (item 3.5.11; Figura 11, painel A). Na reação foram utilizados os oligonucleotídeos #AUAP (sentido direto), fornecido pelo kit 5' RACE (item 3.5.11) e outro específico do gene, #chi2IR (sentido reverso; Tabela 5) e RNA extraído de *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com quitina, em cultivo de 48 h. Um amplicon de 311 pb foi obtido, este foi purificado e seqüenciado. A seqüência do amplicon contendo a região 5' não traduzida do gene *chi2* está mostrada na Figura 11 (painel B). Um esquema com a estratégia utilizada para a realização da técnica, incluindo as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos, está apresentado na Figura 11 (painel C).

A técnica de PCR RACE 5', apesar de indicar o sítio de início de transcrição, não foi completamente elucidativa, pois a região flanqueadora 5' apresentou mais de um códon de início de tradução (ATG, em fases de leituras diferentes). Assim, consideramos o códon AUG que fornecia a fase de leitura do gene ortólogo, já descrito (FREIMOSER *et al.*, 2003). O outro códon AUG (marcados em cinza, Figura 12), fornece fase de leitura diferente que não tem identidade com qualquer seqüência presente nos bancos de dados. A determinação experimental do sítio início de tradução é uma abordagem que ainda pode ser necessária.

Figura 11 – Determinação do sítio de início da transcrição do gene *chi2* de *M. anisopliae* E₆.

Painel A, PCR 5' RACE do gene *chi2*, eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo, (M) marcador de tamanho Lambda / HindIII, número indicado à esquerda em kb; (1) Controle negativo da reação, sem DNA molde; (2) controle sem a enzima desoxinucleotidil-terminal-transferase - TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*); (3) reação contendo os oligonucleotídeos #AUAP (direto) e o específico do gene, #chi2IR (reverso), amplicon de 311 pb; (4) controle positivo da reação com os oligonucleotídeos #chi2F (direto) e #chi2IR (reverso), amplicon de 187 pb. A seta indica o amplicon de 311 pb, produto da PCR 5' RACE do gene *chi2* (canaleta 3), que foi purificado e seqüenciado. **Painel B**, seqüência da região de início de transcrição do gene *chi2*. A primeira seqüência sublinhada corresponde à região de anelamento do oligonucleotídeo #AUAP, fornecido pelo kit para a PCR RACE (item 3.5.11) e a segunda corresponde a região de anelamento do oligonucleotídeo específico do gene *chi2* (#chi2IR; Tabela 5), oligonucleotídeos estes utilizados para a geração do amplicon. Em minúsculas está a seqüência não traduzida e em maiúsculas a seqüência traduzida. O primeiro G transcrito está destacado em vermelho na seqüência (+1). Os números à direita indicam a posição dos nucleotídeos na seqüência. **Painel C**, representação esquemática da região 5' não traduzida (barra sem preenchimento) e da ORF do gene *chi2* (barra em cinza), demonstrando a estratégia utilizada na PCR RACE, com as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos: seta laranja indica o oligonucleotídeo #AUAP, seta azul oligonucleotídeo #chi2F, seta verde oligonucleotídeo #chi2IR e a seta amarela o oligonucleotídeo #chi2IR, que foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA. Estão representados o nucleotídeo +1 (G) e o ATG do provável início de tradução.

A



B

```

+1
ggccacgcgctcgactagtagcacatcaagttggtagtttgagcttgtgtatattctcttcacttctctg 70
tacatggttacatcttttaccgtctttattttgtgtatatcatcgatATGCATCATCATGCATCATCTACG 140
CGCTCTCGTCGGCGTCGGCCTTGCTGGTCTGGCGGCCGGGGTGCCCTTGACTGACAAGATATCAGTCAAG 210
CCACGACAAGCACCCGGAGCGCAAAATGTCGTCTACTGGGGGCAGAACGGCGGCGGTACGATCGAAAATA 280
ACGACCTCGCGGCG T A T T G C C A G C C C A A T T C 311
  
```

C



A análise comparativa da seqüência do gene *chi2*, isolado no presente trabalho, com a seqüência de seu ortólogo depositada no banco de dados (GenBank AJ293217) e a seqüência parcial obtida por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos, demonstrou que o gene *chi2* é interrompido por dois pequenos íntrons de 210 pb e 75 pb, respectivamente. O segundo íntron não apresentou todas as seqüências de processamento normalmente descritas (Figura 12; KUPFER *et al.*, 2004).

A ORF completa do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₆ apresenta 1.545 pb e provavelmente codifica uma proteína de 419 aminoácidos com massa molecular estimada de 44 kDa. A seqüência de aminoácidos foi analisada quanto à presença de peptídeo-sinal cujo o sítio de clivagem provável pode ser identificado na V¹⁹ (Figura 12). Assim a forma madura dessa proteína provavelmente apresenta uma massa molecular estimada de 42 kDa e um *pI* teórico de 4,8. A seqüência deduzida de aminoácidos foi utilizada para a comparação com a seqüência parcial da proteína codificada pelo gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *acridum* (GenBank AJ293217; FREIMOSER *et al.*, 2003), utilizando o programa ClustalX (item 3.5.13). O resultado mostrou que as seqüências apresentam identidade e similaridade de 93% e 97%, respectivamente, e que a seqüência do cDNA do gene *chi2* publicada por FREIMOSER e colaboradores, (2003), estava incompleta pela ausência de nove nucleotídeos, correspondendo a três aminoácidos na região N-terminal, além da ausência da região 5' não traduzida (Figura 13).

Foram, ainda, identificados na seqüência deduzida do gene *chi2* uma região de consenso correspondente ao sítio de ligação à quitina, resíduos conservados de cisteínas, que podem estar envolvidos no dobramento correto do domínio catalítico, e a seqüência NGDFDFDIE, muito próxima da seqüência do domínio DxxDxDxE, que é conservado na família 18 das glicosil-hidrolases, por possuir resíduos de ácido glutâmico e aspártico que podem estar envolvidos no centro catalítico dessas enzimas (AALTEN *et al.*, 2000, Figura 14).

A comparação com seqüências de proteínas depositadas no GenBank, utilizando os programas BLAST, ClustalX e GENEDOC (itens 3.5.12 e 3.5.13), revelou identidade e similaridade relativamente elevadas com alguns ortólogos de fungos, incluindo a presença de resíduos conservados (Tabela 7). As seqüências que apresentaram maior identidade com a proteína deduzida a partir do gene *chi2* estão alinhadas na Figura 14.

A árvore filogenética resultante da comparação entre as seqüências de aminoácidos deduzidas de quitinases de fungos, que apresentaram maiores identidades com a seqüência deduzida a partir do gene *chi2*, está apresentada na Figura 15. Para esta abordagem foram

incluídas as seqüências das quitinases de *M. anisopliae* CHIT42 e CHIT30, deduzidas a partir dos genes *chit1* e *chi3*, respectivamente (BOGO *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2005).

Tabela 7 – Quitinases de fungos com identidade com a quitinase CHI2 de *M. anisopliae* linhagem E₆.

Nome da Seqüência	Organismo	Identidade/Similaridade	Número de acesso
CHI2	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	93% / 97%	CAC07216.1
-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	37% / 51%	GAG81347
-	<i>Candida glabrata</i>	36% / 56%	CAG62749.1
CTS1	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	35% / 54%	NP_013388.1
-	<i>Debaryomyces</i> <i>hansenii</i>	34% / 53%	CAG86633.1
CHT2	<i>Candida albicans</i>	34% / 52%	EAL03025.1
CHT3	<i>Candida albicans</i>	33% / 52%	EAL00460
CTS2	<i>Coccidioides immitis</i>	32% / 50%	JC4566
CHIA	<i>Aspergillus nidulans</i>	32% / 48%	BAA36223.1

A análise comparativa revelou, ainda, similaridade acima de 50%, com quitinases de plantas, como *Hevea brasiliensis* (número de aceso CAA09110.1), *Oryza sativa* (número de aceso NP_917360.1), *Zea mays* (número de aceso AAB47176.2), *Arabidopsis thaliana* (número de aceso BAA21873.1), dentre outras. Todas estas enzimas são classificadas como endoquitinases ácidas pertencentes à classe III da família 18 das glicosil-hidrolases, o que demonstra que a quitinase deduzida do gene *chi2* mostra conservação com as quitinases de plantas, assim como, a quitinase codificada pelo gene *chi3* de *M. anisopliae* (FREIMOSER *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005). Diferentemente, a quitinase CHIT42 de *M. anisopliae*, codificada pelo gene *chit1*, apresenta similaridade com quitinases de bactérias, o que pode ser relevante na determinação da sua função no fungo (BOGO *et al.*, 1998; BARATTO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005).

Figura 12 - Seqüência do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆.

A seqüência de aminoácidos é mostrada em letras maiúsculas, acima da seqüência de DNA. A proteína madura deduzida é precedida pelos resíduos GVP que estão sombreados em verde. Os íntrons estão representados em letras minúsculas e em itálico. Os resíduos de aminoácidos do provável centro catalítico da quitinase estão destacados em amarelo e a seqüência de um provável sítio de ligação à celulose, está em azul. Sombreado em preto, estão os códons propostos de início e de termino da tradução. Em cinza está sombreado o códons de início de tradução ATG fora de fase de leitura. O primeiro nucleotídeo incorporado na transcrição está sombreado em vermelho (nucleotídeo +1). Os números à direita, em preto, indicam a posição dos nucleotídeos nas seqüências e, em azul, a posição dos aminoácidos na proteína deduzida. A seqüência de nucleotídeo sublinhada compreende o fragmento utilizado como sonda nos experimento de *Southern*. O fragmento isolado não possui as seqüências de terminação de transcrição e nem sinais de poliadenilação detectáveis.

+1
gtgCGctggatggatgagtggttgtaaaatgatataaacaggccccgaattaactgcggatggacggcca 70
tgtattgacatcaagttggtagtttgagcttgtgtatattctcttcacttctctgtacatggttacatct 140
M H H L R A L V G V G L A 13
tttaccgtctttattttgggtatatacatcgatATGCATCATCTACGCGCTCTCGTCGGCGTCGGCCTTGC 210
G L A A G V P L T D K I S V K P R Q A P G A Q 36
TGGTCTGGCGGCCGGGTGCCCTTGACTIONGAGATATCAGTCAAGCCACGACAAGCACCCGGAGCGCAA 280
N V V Y W G Q N G G G T I E N N D L A A Y C Q 59
AATGTCGTCTACTGGGGCAGAACGGCGCGGTACGATCGAAAATAACGACCTCGCGCGGTATTGCCAGC 350
P N S G I D V L V L A F L Y Q F G N G G N I P S 83
CCAATTCCGGAATCGACGTTTTGGTTCTTGCATTTCTGTATCAATTTGAAATGGCGGCAACATACCTTC 420
G T I 88
AGGCACTATAGgtcagttttttttttatttttattttctattttacgttttaaaatttattactctcatgg 490
aagccgagagcgatggagagggctacgtatctatctatacatgtatagaaatacgcgcacatctcgtagca 560
gcaggctactcccctgaccagctttttctattcattttcccttcccttgttttcgaatgtccgagttctaa 630
G Q S C Y I S T S G Q G Q N C E A L T A 106
cctcaatacagGTCAGTCATGCTACATCAGCACGTCGGCCAGGGTCAAACTGCGAAGCCCTCACCGCAG 700
A I H T C Q S A G V K I V L S L G G A T S S Y S 130
CCATACACACCTGCCAGTCCGCCGGTGTCAAGATCGTCCCTCGGCCGCGCAGTACTACTCTACTC 770
L Q T Q A Q A E Q I G Q Y L W D S Y G N S G N 153
CCTCCAGACGCAGGCCAAGCCGAGCAAATAGGCCAGTACCTATGGGACTCGTACGGCAACTCTGGAAAC 840
K T V Q R P F G S N F V N G F D F D I E V N G 176
AAGACGGTGCAGCGGCCGTTTGGCAGCAACTTTGTCAACGGGTTTCGACTTCGACATTGAAGTCAACGGCG 910
G S S Q Y Y Q Y M I A K L R A N F A S D K S N T 200
GCAGCAGCCAGTACTACCAGTACATGATTGCCAAGCTGCGCGCCAACCTTTCGCTCGGACAAGTCCAACAC 980
Y L I T G A P Q C P I P E P N M G V I I S N S 223
GTACCTGATTACCGCGCGCCGACGTGCCCCATCCCCGAGCCCAACATGGGCGTCATCATCAGCAACTCC 1050
V F D H L Y V Q F Y N N N N Y T V P C A L G I 246
GTCTTTGACCATCTCTACGTCCAGTTCTACAATAATAACAACACTACACGGTCCCCGCGCGCTGGGCATCA 1120
N G N A P F N Y N N W T S F I A D T P S A G A K 270
ACGGCAACGCCCCCTTCAACTACAACAACACTGGACCTCCTTTATCGCCGACACGCCGTCCGGCCGGTGCCAA 1190
I F I G V P A S P L A S T G T P S G A Q Y Y A 293
GATCTTCATTGGCGTGCCGGCTCGCCGCTCGCGTCGACGGGGACGCCAGCGGCGCGCAGTACTACGCC 1260
A P E Q L A A I V G E Y R S D A H F G G I M M 316
GCGCCGAGCAACTGGCCGCATTGTTCGGCGAGTACAGGAGCGACGCCATTTTCGGCGGCATCATGATGT 1260
W S A G F S D A N V N D G G C T Y A Q Q A K S I L 340
GGAGCGCGGGATTTTCGGATGCCAATGTCAACGACGGGTGCACGTATGCGCAGCAGGCAAAGAGTATCCT 1330
V N G A P C P S S G P P S S T P A T A P A P T 363
CGTCAACGGGGCGCCTTGCCCATCGTCCGGGCTCCGAGTTCTACGCCGCAACAGCCCCGCCCCGACC 1400
A T T M P S S T S V S S P T A S P T G G T V P 386
GCGACCACGATGCCATCTTCGACTTCGGTGTCTCTCCGACAGCGTGCCTACCGGCGGCAC'TGT'CCCC 1470
Q W G Q 390
AGTGGGGTCAGgtgattttatccatgtgctctttgaagaaaaaaaaaagaatctcgcgcggttagctcaca 1540
C G G E G Y S G P T Q C V P P Y Q C 409
cagtagcgacgtctagTGCAGCGGCGAGGGCTATTCGGTCTTACCAGTGCCTTCCCCCTTACCAATGT 1610
V K Q G D W W S S C R * 419
GTCAAGCAAGGCGATTGGTGGTCTCATGCCGTTGAagtcggtcgccggcgcataccatctacaagact 1680
ggttgcatcgatggatgagtgctggtatgctgcag 1713

CHI2 (E6): MHHLRALVGVGLAGLAAGVPLTDKISVKPRQAPGAQNVVYWGQNGGGTIENNDLAAYCQ : 59
 CHI2 (Ac): ---LRALAGVGLVGLASGVPFITDNISIKPRQAPGAQNIIVYWGQNGGGTIENNDLAAYCQ : 56

 CHI2 (E6): PNSGIDVLVLAFLYQFGNGGNIPSGTIGQSCYISTSGQGQNCALTAAIHTCQSAGVKI : 118
 CHI2 (Ac): PNSGIDVLVLAFLYQFGNGGNIPSGTIGQSCYISTSGQGQNCALTAAIQTCQSAGVKI : 115

 CHI2 (E6): VLSLGGATSSYSLQTOAQAEQIGQYLWDSYGNSGNKTVQRPFGSNFVNGFDFDIEVNGG : 177
 CHI2 (Ac): ILSLGGATSSYSLQTOAQAEQIGQYLWDSYGNSGNKTVQRPFGSNFVNGFDFDIEVNGG : 174

 CHI2 (E6): SSQYYQYMIAKLRANFASDKSNTYLIITGAPQCPIPEPNMGVVISNSVFDHLYVQFYNNN : 236
 CHI2 (Ac): SSQYYQYMIAKLRSNFSGDEANTYIITGAPQCPIPEPNMGVVISNSVFDHLYVQFYNNN : 233

 CHI2 (E6): NYTVPCALGINGNAPFNYNWNTSFIADTPSAGAKIFIGVPASPLASTGTPSGAQYYAAP : 295
 CHI2 (Ac): NYTVPCALGINGNAPFNYNWNTSFIINTPSANAKVFIGVPASPLASTGTPSGAQYYATP : 292

 CHI2 (E6): EQLAAIVGEYRSDAHFGGIMMWSAGFSDANVNDGCTYAQQAKSILVNGAPCPSSGPPSS : 354
 CHI2 (Ac): DQLAAIVGEYKGDDAHFGGIMMWSAGFSDANVNGCTYAQQAKNILVNGAACGSSGPPIP : 351

 CHI2 (E6): TPATAPAPTATTMPSSTSVSSPTASPTGGTVPQWGQCGGEGYSGPTQCVPPYQCVKQGD : 413
 CHI2 (Ac): TPTTTPATTTPTTASST--FSPTASPTGGTVPQWGQCGGEGYSGPTQCVPPYKCVKQGD : 408

 CHI2 (E6): WWSSCR : 419
 CHI2 (Ac): WWSSCR : 414

Figura 13 - Comparação entre as proteínas deduzidas a partir do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e var. *acridum*.

Alinhamento entre a seqüência da quitinase CHI2, deduzida do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₆ (E6) e a quitinase CHI2 de *M. anisopliae* var. *acridum* (Ac; número de acesso AJ293217). As seqüências apresentam 93% de identidade. Os números à direita indicam a posição dos aminoácidos na proteína predita. As seqüências sombreadas em cinza representam os aminoácidos diferentes. Os traços foram introduzidos para maximizar o alinhamento.

Figura 14 – Comparação entre as seqüências de aminiácidos da quitinase CHI2 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆ com outras quitinases de fungos depositadas no Genbank.

Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆ e var. *acridum* (CHI2 Ac; número de acesso CAC07216.1) com outras quitinases de fungos depositadas no Genbank: quitinase hipotética de *D. hansenii* (CHIH Dh, CAG86633.1), CHT2 (Ca, EAL03025.1) e CHT3 (Ca, EAL00460) de *C. albicans*, quitinase hipotética de *C. glabrata* (CHIH Cg CAG62749.1), CTS1 de *S. cerevisiae* (Sc, NP_013388), CHIA de *A. nidulans* (An, BAA36223.1) e CTS2 de *C. immitis* (Ci, AAA92642.1). Os números à direita indicam a posição dos aminoácidos na proteína predita. As seqüências sombreadas em preto ou coloridas representam aminoácidos idênticos. As seqüências marcadas em cinza escuro representam aminoácidos com identidade de 80%. As seqüências marcadas em cinza claro representam aminoácidos com identidade de 60%. Os traços representam seqüências ausentes ou que foram inseridos para maximizar o alinhamento. A região de consenso sombreada em vermelho representa o sítio de ligação à quitina, a região em azul representa os aminoácidos altamente conservados contendo resíduos de ácido glutâmico e aspártico que estão implicados no mecanismo catalítico dessas enzimas e em verde os resíduos conservados de cisteína envolvidos no dobramento do domínio catalítico. À esquerda do alinhamento esta o nome da proteína e a abreviatura do organismo correspondente.

CHIH (Dh) : -----MFVSLIVSQIILLIKIVSALEVGGSSNNVAVYWGQNSGG--SODRLSTYCF--SDSVD : 53
 CHT2 (Ca) : -----MLSFKSLAAAVVASSALASASNOVALYWGQNGAG--GQERLAQYCO--ETDVD : 50
 CHIH (Cg) : -----MIQILLPLLFILSTVFAFDINSKTNVAVYWGQNSAG--SOKSLASYCO--NTEAD : 51
 CTS1 (Sc) : -----MSLYIILLFTQFLLLPDAFRSANTNIAVYWGQNSAG--TOESLATYCF--SSDAD : 54
 CHT3 (Ca) : -----MLYLLTIFSLLLPALAINARNSNSNVAVYWGQNSGG--SQORLSYYCD--SDAVD : 50
 CHIA (An) : -----MAPKIFTFVSAISGLASLASAFHAEAKSNIAYVYGGQVNV---CPRLAEFCA--ETSYD : 53
 CTS2 (Ci) : -----MGPTNIIAFAFVSSLFIQSLALNPYAKSNLAVYWGQNGAG---CNRLSYFCF--KTSFD : 54
 CHI2 (Ac) : ---LRALAGVGLVGLASGVPFTDNISIKPRQAPGAQNTVYWGQNGGGTTIENNDLAAAYCOPNSGID : 62
 CHI2 (E6) : MHHLRALVGVGLAGLAAGVPLTDKISVKPRQAPGAQNVVYWGQNGGGTTIENNDLAAAYCOPNSGID : 65

CHIH (Dh) : IVLLSFLNFPN--DFN---LNFANQCGMTFED-G-----VLHCSAIGEDIKTCOAGKTVL : 104
 CHT2 (Ca) : IVLLSFLNFPD--PIN---VNFANQCGMTFES-G-----LLHCSQIGADIKTCOSLGTKVLL : 101
 CHIH (Cg) : IFLLSFMNSFP--AIG---LNFADACTTFPD-G-----LLQCSQIAEDIKTCOSLGGKVL : 101
 CTS1 (Sc) : IFLLSFLNQFP--TIG---LNFANACSDTFSD-G-----LLHCTQIAEDIETCOSLGGKVL : 104
 CHT3 (Ca) : IVLLSFMHCFPS--PIQ---LNFANACEGITYTANG-----ILQCQTIAEDIKYCONKGTIL : 102
 CHIA (An) : IINIGFINSFPEQNPITGLPGSDFGNQCWADTFVVD-GIASQLYSHCPNIAEDIKPKCOAGKQVF : 117
 CTS2 (Ci) : IIVVGFINVFEDQGPAG-WPGSNFNGQCADSYYYTKNGTKKLLDGCYQIKEDLPKCKALGKTI : 118
 CHI2 (Ac) : VLVLAFLYQFNGGNIP---SGTIGQSCYISTSGQG-----QNCEALTAALQTCOSAGVKLI : 116
 CHI2 (E6) : VLVLAFLYQFNGGNIP---SGTIGQSCYISTSGQG-----QNCEALTAALHTCOSAGVKLI : 119

CHIH (Dh) : LSLGG--GIGNYGFSTDAEAVDFASTLWNKFGAGTSAD-----ERPFDDAVVDGDFDIEENNOV : 162
 CHT2 (Ca) : LSLGG--GVGDYGFSDVASATKFADTLWNKFGAGEDP-----ERPFDDAVVDGDFDIEHGGAT : 158
 CHIH (Cg) : LSMGG--ASGAYGFADDAQAEAFATTLWNTFCEGSDISV---ERPFGQSIVDGDFDIEENNGK : 160
 CTS1 (Sc) : LSLGG--ASGSYLFSDDSQAEETFAQTLWTFEGEGTAS-----ERPFDVAVVDGDFDIEENNEV : 162
 CHT3 (Ca) : LSLGG--AAGSYGFSDDATAKQFAHTLWDLFGNSKNLATN---DRPFYDAVLDGDFDIEENNST : 162
 CHIA (An) : LSLGG--ATPTYWFDTIDASTKLDLWGFAGCFPVTDKPRPFGNVAVVDGDFDIEFFGSK : 180
 CTS2 (Ci) : LSLGGAVVHDFYEVKSEESALNFADFLWGAFGPLTPDWTG---PRPFGEASVDGDFDIEKGSNF : 180
 CHI2 (Ac) : LSLGG--ATSSYSLOTQAQAEQIGQYLWDSYGNNGKNT---VORPFGSNFVNDGDFDIEVNGGS : 175
 CHI2 (E6) : LSLGG--ATSSYSLOTQAQAEQIGQYLWDSYGNNGKNT---VORPFGSNFVNDGDFDIEVNGGS : 178

CHIH (Dh) : G--YVALANEIRTLFDQSSKSYVLSASPOCPYPDQSVGDIISNANLDFAFIQFYNNYCSLDQ-- : 223
 CHT2 (Ca) : G--YPEIATLRGKFAKDTSKNYFLSAAPOCPYPDASLGDLLSKVPLDFAFIQFYNNYCSIN--- : 218
 CHIH (Cg) : G--YAALVSKLRQLFS--NGSKQYIISAAPOCPYPDASVGDILLANADVDFAFIQFYNNYCNVE--- : 219
 CTS1 (Sc) : G--YSALATKLRTLFA--EGTKQYIISAAPOCPYPDASVGDILENADIDFAFIQFYNNYCSVS--- : 221
 CHT3 (Ca) : G--YPAIATELRTLFDQSSKSYVLSASPOCPYPDASVGDILLKQSEIDVFIQFYNNYCNLGS-- : 223
 CHIA (An) : G--YANMLKRFRQRFGVEVDQTFYIISAAPOCSIPDEQLSVALKNAVIDFVWQFYNTPGCSARNF : 243
 CTS2 (Ci) : G--YSIMVRRRLRELFLQPLNRYIISAAPOCIMPDKYLSHATSNSAFDFFIQFYNNYPCSARKW : 243
 CHI2 (Ac) : SQYQYMIAKLRSNFGSDEANTYIITGAPQCIPEPEPNCVLIISNSVFDHLYVQFYNNNYTVPCA : 240
 CHI2 (E6) : SQYQYMIAKLRANFASDKSNTYLIITGAPQCIPEPEPNCVLIISNSVFDHLYVQFYNNNYTVPCA : 243

CHIH (Dh) : -----SEFNWNTWSDFAKS--APNDITKLFVGLPG-----APASNGYV--DAATVAKTIDEIKC : 274
 CHT2 (Ca) : -----GQFNWDIWSKFAKS--APNKNIKLFVGVLP-----ATSNIAGYV--DTSKLSAIEIKC : 268
 CHIH (Cg) : -----AQFNWDDWKNFAINTSPNKNIKLYLGLPGA-----PSAAGSGYISNLDNLKSVIKEISS : 273
 CTS1 (Sc) : -----GQFNWDITWLTVAQTVPSPNKNIKLFVGLPGS-----ASAAGSGYISDTSLESTADIAS : 275
 CHT3 (Ca) : -----SSEFNWDITWLNVAETDSPNKNIKLFVGVLPAS-----SRAAGSGYNDPSEAVSQYLTSIDLN : 277
 CHIA (An) : VLGTKNG--FNYSWVEVIKA--GANPNKLYVGLPAS-----GAAANLGYLTPPEVSKPLVKKYMD : 301
 CTS2 (Ci) : VTNPKSVTYVDDWVKYIRK--SGNPLAKLYVGLPAS-----KSAAAKEDYLTPEEATKIVSTYMA : 302
 CHI2 (Ac) : LGINGNAPFNYYNNWTS--ISN--TPSANAQVFIGVPPASPLASTGTTPSGAQYATPDQLAAIVGEYK : 304
 CHI2 (E6) : LGINGNAPFNYYNNWTS--IAD--TPSAGAKIFIGVPPASPLASTGTTPSGAQYAAPEQLAAIVGEYRS : 307

CHIH (Dh) : DQ--ALCGISLWDASSAFNTVNVANDVNIYEQVASTINSEECSSASS-----SSSVASSLITQSS-- : 329
 CHT2 (Ca) : DS--HFAGVSLWDASGAWLNTDEKGENFVQVKNVNLQNAQVAPS-----SSATQSTITTS : 324
 CHIH (Cg) : LA--NFCGISLWDASQATSNVID--CADYLSQMKNILK-----SAAGSTETPTTS-- : 319
 CTS1 (Sc) : SS--SFCGISLWDASQAFSNELN--GEPYVBIKKNLITSASQTATTTVATSKTSAASTSSATSS-- : 336
 CHT3 (Ca) : SK--YFCGISMWDVSAGWSNTNS--NGNFVENKAIIVKASPGTEET-----TSSSTTTTITTTST : 333
 CHIA (An) : KYPETFCGVMLWEATQARNNOID--GVGNKIREILYDLDPNHPPP--TTPTPTPTPTPTTS-- : 362
 CTS2 (Ci) : KYPSTFCGMVWEATASENNKLG--GLPYADIMKEVILRCDDPPTS--TVTSTTSASTSTOTSSQ : 364
 CHI2 (Ac) : DA--HFCGIMMWSAGFSDANVNN--CCTMAQQAKNILVN-----GAACGSSGPPIP : 351
 CHI2 (E6) : DA--HFCGIMMWSAGFSDANVND--CCTMAQQAKSILVN-----GAPCPSSGPPSS-- : 354

CHIH (Dh) : -----SSSSTSNDMTASATSS-----NEITG : 350
 CHT2 (Ca) : -----AVTQSTTTTSAATIQSATTSAAVTTKSNQIVTSSSSSSSIFYGNSTTE : 374
 CHIH (Cg) : -----SSYSMPNSLINTIQEQS-----SSVLVSVER : 346
 CTS1 (Sc) : -----ASTSQKKTOSTTSTQSKSKVTL-----SPTASSAIKTSITQ : 373
 CHT3 (Ca) : -----TISSSSSSKTSKSTSTTS-----SSISSTSTTS : 366
 CHIA (An) : -TTSTTSTSATSTTTST : 421
 CTS2 (Ci) : STTMETKTLASSTTPSSPSIVSPSSMOTITGSTSIETVTTTRSQEPPTTISTRSASTEPVTR : 429
 CHI2 (Ac) : -----TPTTTPATTTPTASST----- : 368
 CHI2 (E6) : -----TPATAPAPATITMPSSTS-----V- : 373

CHIH (Dh) : ASSA-----LSLVSTLPHYSN--GSVTSGLVSSDEGTATVIGIQTITITVTSKSDNH : 401
 CHT2 (Ca) : SSTG-----IATGTVLPTGNSENAATIGSGNKLKLAISIVDQVKIVITITSCSEHK : 426
 CHIH (Cg) : TTTT-----LEPSTIIS-----SSFSDSAPTPINSHITTLQPNTPPAA : 388
 CTS1 (Sc) : TTKT-----LTSSTKTKSSLG--TTTSTLNSVAITSMKTLSSQITSAALVPPQT : 423
 CHT3 (Ca) : STSS-----SSTSSSTSTSTSTSTSSQISTTSTAPTSTSTLSSSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTST : 418
 CHIA (An) : SPKP-----SPSESSTSETSSLPSTSPVSETPSETKTPSSSAPPLSSSPVGGSSSTASS : 480
 CTS2 (Ci) : SQEPPSTTISTRASSTETVTRSQEPSTTISTWSASTETSTSSQDSSPTIISTKSAPTGTVTR : 494
 CHI2 (Ac) : -----FSPTASPTGGTVPQWQCGGEG : 390
 CHI2 (E6) : -----SSPTASPTGGTVPQWQCGGEG : 395

CHIH (Dh) : CSKVPIEIG-VTVVTEGSTSYITTCPLDNTIPSTETVSDVATTVITVITSCQDNKCDFATVITGLT- : 464
 CHT2 (Ca) : CVATPVTIG-VVVVTDIDTVYITTCPLINSQVYVPVQTVVCTEETCVPSPTSTAQKPKASTTIKG : 490
 CHIH (Cg) : AQD---SSANVQVSVTPSTTTITPDSPSNHLN----DVSPSTPAP--SSPANPSPDTPAHT- : 442
 CTS1 (Sc) : TTTSIIVSSAPIQTAITSTLSPATKSSSVLSQTATTSTLSPTTTSTSSGSTSSGSTSSDSTART- : 487
 CHT3 (Ca) : SVTSSETIP-VVTPSSLSSAITIPGDSITGIGSKS-SSTKPATSTTSALSSSTTTVATIPDDKE- : 480
 CHIA (An) : STSTPSEIPSTSSSTRAVSETSITHISTSTSSGPETSLTGSSTVVPATSSSVSSAISPSSTPVIS- : 544
 CTS2 (Ci) : SQDLPSTIISTRSPETEETATTKSQGSPSITLSTRSSSAETVSTRSQHSSSTTISTKSAPTETG : 559
 CHI2 (Ac) : YSGPTQCVPPYKCVKQGDWWSSCR----- : 414
 CHI2 (E6) : YSGPTQCVPPYKCVKQGDWWSSCR----- : 419

 CHIH (Dh) : ----VVTEFDTVYTTTCPLTTESTAQNTITNSAS-VTQSDKTIAHSTVYPTS----- : 511
 CHT2 (Ca) : VEKGQTTSYPVVGTTEGVKKIVTTSAQTVGSSSTKYVTIELTSTITPVTYPTSV----- : 543
 CHIH (Cg) : ----IAKQLNAQYAAGQFNGKSSCQDGEIACSD---G---KFAMCAHGSW----- : 483
 CTS1 (Sc) : ----LAKELNAQYAAGKLNKSTCTEGETIACSD---G---KFAVCDHSAW----- : 528
 CHT3 (Ca) : ---IINTPTDTEITTSKPPALITESDATITIQNLIT--PS-TTTKNVKTSTNI----- : 526
 CHIA (An) : ----ETPRPPVTTSSSSSTFVSSSTSTSTDCSESS---TAIGTHSSSSIWETP----- : 588
 CTS2 (Ci) : TTSEHSTSMPVSTRSASTETVITRSONSDSQSMT---VSTRSPSTESITTRSQGSPSETFSTKSV : 621
 CHI2 (Ac) : ----- : -
 CHI2 (E6) : ----- : -

 CHIH (Dh) : -----QNQTVAAIETYAEGMGSIVAGSWT----- : 535
 CHT2 (Ca) : -----ASNGTNTVPVFTFEGGAAVANSLSN----- : 569
 CHIH (Cg) : -----VEMACAAGTTCYAYDSGNSVFTQCN----- : 508
 CTS1 (Sc) : -----VYMECASGTTTCYAYDSGDSVYFTQCN----- : 553
 CHT3 (Ca) : -----VTEWVWAPTTLRRLTTTYQLLTTTRTH----- : 552
 CHIA (An) : -----SASTPAASPSTSPETTKTLTVFP-----RRAPPCLPEPPPRPL : 626
 CTS2 (Ci) : PVDTISTELPSQTPTTIIITGTPSDPVSAPTTVPPNPPTLITAPSSSTTEDRITITTTIITTSVTV : 686
 CHI2 (Ac) : ----- : -
 CHI2 (E6) : ----- : -

 CHIH (Dh) : --LAIAAIFASLL----- : 546
 CHT2 (Ca) : VWFPVPFLLAAFAF----- : 583
 CHIH (Cg) : ---YVDLKASFV----- : 517
 CTS1 (Sc) : ---FSYLESNYF----- : 562
 CHT3 (Ca) : IETVFAEPSTVVIYN----- : 567
 CHIA (An) : CPALFPQLAVATRKP-----QPCQPPVP-----TRHPAPRPASL----- : 660
 CTS2 (Ci) : CPTGFTTVTITYTTTTYCPETASLTPTQPPPIPGAPAPPDGTWTTIVTVCPQCAPPTTTITLTVPTR : 751
 CHI2 (Ac) : ----- : -
 CHI2 (E6) : ----- : -

 CHIH (Dh) : ----- : -
 CHT2 (Ca) : ----- : -
 CHIH (Cg) : ----- : -
 CTS1 (Sc) : ----- : -
 CHT3 (Ca) : ----- : -
 CHIA (An) : ----- : -
 CTS2 (Ci) : SAFLPARTETRPVTVVVPENPIKNVKPSESGDFVTVTTAAPATVTKTLEYNNPVDSVNVQPT : 816
 CHI2 (Ac) : ----- : -
 CHI2 (E6) : ----- : -

 CHIH (Dh) : ----- : -
 CHT2 (Ca) : ----- : -
 CHIH (Cg) : ----- : -
 CTS1 (Sc) : ----- : -
 CHT3 (Ca) : ----- : -
 CHIA (An) : ----- : -
 CTS2 (Ci) : GGSSPVEFEFSAMTVRSMDVVAKALITAGALCWDCSWGYNLLIC : 860
 CHI2 (Ac) : ----- : -
 CHI2 (E6) : ----- : -

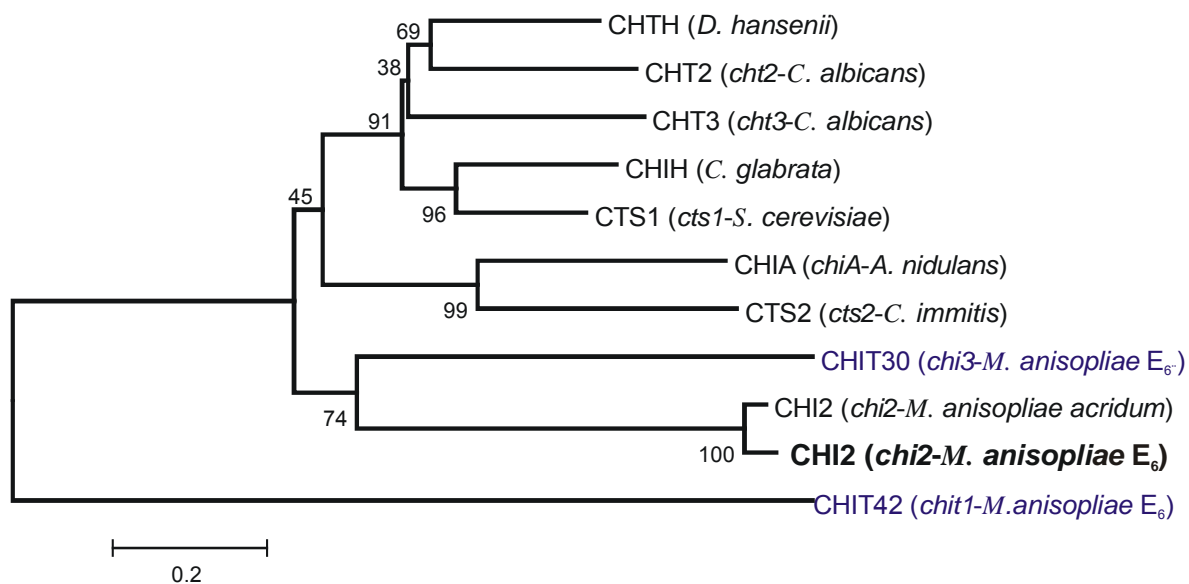


Figura 15 – Árvore filogenética elaborada pela metodologia Neighbor-joining formada pela comparação entre quitinases de fungos.

A árvore filogenética foi formada através da comparação das seqüências correlacionadas de quitinases de diferentes fungos (Figura 14), compreendendo: o gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₆ (em negrito; presente trabalho) e var. *acridum* (número de acesso CAC07216.1) com outras quitinases de fungos depositadas no Genbank: quitinase hipotética de *D. hansenii* (CAG86633.1), CHT2 (EAL03025.1) e CHT3 (EAL00460) de *C. albicans*, quitinase hipotética de *C. glabrata* (CAG62749.1), CTS1 de *S. cerevisiae* (NP_013388), CHIA de *A. nidulans* (BAA36223.1) e CTS2 de *C. immitis* (JC4566). Foram acrescentadas as seqüências das quitinases deduzidas de *M. anisopliae* E₆ CHIT30 (AAS55554) e CHIT42 (AAB81998.1), destacadas em azul. As quitinases hipotéticas e sem nome foram chamadas de CHIH. A confiança da árvore foi avaliada por um *Bootstrap* de 10.000 e os valores de confiabilidade do resultado entre as seqüências estão demonstrados na Figura. O comprimento da barra representa o número de substituições de aminoácidos das seqüências.

A seqüência compreendendo a região 5' flanqueadora de 980 pb do gene *chi2* também foi analisada (Figura 16). Para a identificação de possíveis elementos envolvidos na regulação transcricional, foi utilizado o programa para análise de elementos reguladores (item 3.5.13) e a partir da comparação com outras seqüências de consenso, foram identificados possíveis elementos dos fatores gerais de transcrição (*core promoter consensus sequences*) *CAAT box* (CAAT) e *TATA box* (TATAA), localizados a distâncias apropriadas a montante do provável início de tradução ATG. Foi também identificada a seqüência ACATCAAG, semelhante à seqüência de consenso do elemento de início de transcrição TCATCANC (EBERLE & RUSSO, 1994), posicionado, a 86 pb a montante do códon de início de tradução e que coincide com o início de transcrição caracterizado (Figura 16).

Como, até o momento, não há dados na literatura descrevendo elementos promotores envolvidos na ativação da expressão gênica em resposta à presença de quitina em fungos, nesta análise, foram priorizados os elementos importantes na repressão gênica em resposta a glicose e aqueles envolvidos na regulação por presença ou ausência de nitrogênio, elementos CREA e GATA, respectivamente. Entretanto, a partir da análise das seqüências, foi encontrado apenas um possível elemento CREA (CCCCAC), localizado 410 pb a montante do provável códon ATG de início de tradução. Nenhuma seqüência similar ao elemento GATA foi encontrada.

Com a finalidade de verificar se a ausência destes elementos é um fenômeno comum entre as possíveis seqüências reguladoras de genes de quitinases de fungos filamentosos, foi efetuada a análise e a comparação de seqüências das regiões flanqueadoras 5' de alguns genes de quitinases já descritos (Figura 17). Nesta abordagem, foi dada ênfase aos elementos reguladoras gerais *CAAT box* e *TATA box*, e aos elementos envolvidos na resposta a presença de glicose, elemento CREA e em resposta ao nitrogênio, elemento GATA. Os genes que tiveram seus promotores analisados *in silico* foram os genes *chit1* (840 pb) e *chi2* (900 pb), de *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998; BOGO, 1999; presente trabalho), gene *ech42* (830 pb), de *Trichoderma harzianum* (CARSOLIO *et al.*, 1994), gene *chiA* (620 pb), de *Aspergillus nidulans* (TAKAYA *et al.*, 1997), gene *chiB* (695 pb), de *Aspergillus fumigatus* (JAQUES *et al.*, 2003), e gene *cts1* (430 pb), de *Coccidioides immitis* (PISHKO *et al.*, 1995). O gene *chiB*, com 700 pb de, *Aphanocladium album* também foi analisado, entretanto, nenhum desses elementos foi lá encontrado. A análise sugere que não existem elementos conservados que possam ser identificados por análise *in silico*.

Outro elemento analisado nestas regiões reguladores foi o elemento de consenso envolvido na resposta ao estresse, caracterizado pelas seqüências AGGGG ou CCCCT. Estas

seqüências foram identificadas apenas nos promotores dos genes *ech42*, com quatro elementos (BRUNNER *et al.*, 2003) e no seu ortólogo em *Metarhizium*, o gene *chit1*, com dois elementos (detalhes item 4.2 dos Resultados).

```

TCGTGCAGACAGGATACAATTGACTTCAAATGTCAAGTTCACAAGGCCATGATCCTCCGTGTAAGTAGCG 70
CTGTTTCTCATTFFFFTATAGTGGCAGGTGAAGGGTCTGGTCTTAACCAGATCAGGTACCTGGCTATCGCG 140
CTCAAACATTAACATAATAATACTAGTTGACCCGTTGGCATCTAGTCTGGTAGTAACATAACCCACTTA 210
GTTGTCAACGGGACGGCATATTAGTGTATACTTGTGGTGGGTAAATCCATCCTGCCACCGACTGTTATT 280
TCACTAGCTTACACCAGATGTAATTGATCCATGTCCATGTGGCCCGTGGCAGGTCAATGGAACCTCGCGA 350
CTCCAACCTCGCTAGACGCTCGTGTGCCCGGAGGCAAGACATCAGATCCTCGTGCCCGACAAGGCCAATGA 420
AACCCTCAAGCCAACGCAGGAACATTCAACTCTCAGGCACGCATCAGCTAGTCCCTGCAAAACCCGGCC 560
ACGAATGGCCGATAGCTTACACGGCAAAAGCGACTACGGGTTCTCGGCACGCCGTGTGCCTCATGTTGTC 630
ACTCGACGCTCCTCGAGCTCGTCACGGGGAGGCAATTGAAGATGGATGACACAGCTTCATTCCTGTCCAT 700
GCAACGTCTCCTCCTAAACGTGGTGCTGTCTCGCGTGCCTCTCAGCTCGCAATGCCGTTCCACGTGTCGA 770
CTTGGGAGCTTGGTATGTAGCCGGGCTCCTCGTGCCTGGATGGATGAGTGTGTGAAAATGATATATAA 840
CAGGCCCGAATTAACCTGCGGATGGACGGCCATGTATTGCACATCAAGTTGGTAGTTTGTGAGCTTGTGTATA 910
TTCTCTTCACTTCTCTGTACATGTTACATCTTTTACCGTCTTTATTTTGTGTATATCATCGATatgcatc 980
M H H

```

Figura 16 - Região flanqueadora 5' do gene *chi2* e alguns prováveis elementos envolvidos na sua regulação.

Seqüência de nucleotídeos da região flanqueadora 5' do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₆. Estão realçadas as seqüências de possíveis elementos envolvidos na regulação da expressão do gene *chi2* de *M. anisopliae*. Os quadrados com diferentes cores representam prováveis elementos em particular: vermelho, CREA; verde claro, CAAT Box; amarelo, TATA Box; e cinza, início de transcrição. Os números à direita indicam a posição dos nucleotídeos na seqüência. Está representado o sítio de início de tradução do gene *chi2* em letras minúsculas e abaixo, em itálico, os primeiros aminoácidos deduzidos.

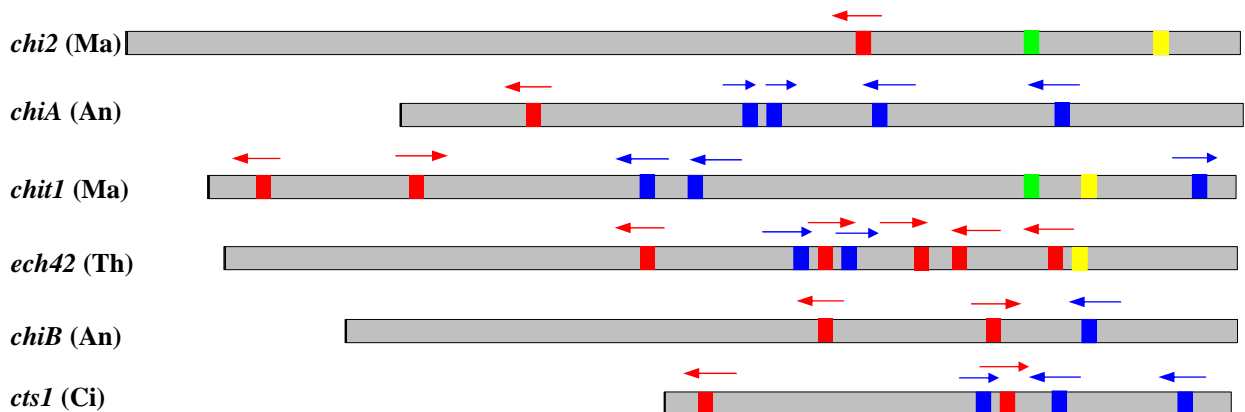


Figura 17 – Comparação entre as regiões reguladoras de genes de quitinases de fungos.

Esquema comparativo demonstrando a distribuição estrutural dos principais prováveis elementos regulatórios presentes na região flanqueadora 5' de diferentes genes de quitinases de fungos filamentosos já caracterizados ou parcialmente caracterizados. À esquerda do esquema representativo, está o nome do gene e a abreviatura do organismo correspondente. Foram utilizadas a região flanqueadora 5' dos genes *chi2* e *chit1* (BOGO *et al.*, 1998; BOGO, 1999) de *M. anisopliae* E₆ (Ma), *chiA* de *A. nidulans* (An; TAKAYA *et al.*, 1997) e *chiB* de *A. fumigatus* (Af; JAQUES *et al.*, 2003), *ech42* de *T. harzianum* (Th; CARSOLIO *et al.*, 1994) e *cts1* de *C. Immits* (Ci; PISHKO *et al.*, 1995). As barras compreendem a região reguladora e os quadrados com diferentes cores representam prováveis elementos em particular: vermelho, CREA; azul, GATA; verde, CAAT Box; e amarelo, TATA box. As setas indicam a orientação dos elementos.

4.2 Análise do padrão de expressão dos genes *chit1* e *chi2* em condições vegetativas e de infecção de *M. anisopliae*

Para analisar os níveis de transcrição dos genes *chit1* (BOGO *et al.*, 1998) e *chi2* da linhagem E₆ (presente trabalho), foi utilizada a técnica de RT-PCR (item 3.5.10). Os RNAs foram extraídos de micélio de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E₆ cultivado em diferentes meios de cultura contendo meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose 1%, N-acetilglicosamina (NAcGlc) 0,1% , cutícula 1% ou quitina 0,8%; de acordo com o item 3.3.2.1). Foram testados diferentes tempos de cultivo (18, 30, 48 e 72 horas). O gene *tef1α* de *M. anisopliae* E₆ (Nakazato, comunicação pessoal, número de acesso AY445082) foi utilizado como controle interno, para padronizar a quantidade de primeira fita de cDNA sintetizada (item 3.5.10), a ser adicionada para cada condição de cultivo, nas diferentes reações de amplificação. Foram feitas reações sem a adição da enzima transcriptase reversa como controle da presença de DNA genômico contaminante para cada condição de cultivo, não sendo observada qualquer amplificação. O tamanho do fragmento amplificado também serviu como controle para determinar a possível presença de DNA genômico no RNA, pois os oligonucleotídeos compreendiam região contendo introns. O tamanho dos fragmentos de DNA genômico e de cDNA gerados com os oligonucleotídeos específicos para os genes *chit1*, *chi2* e *tef1α*, foram: amplicon genômico de *chit1*, 472 pb, e de cDNA 230 pb, amplicon genômico de *chi2*, 625 pb, e de cDNA, 402 pb, e amplicon genômico de *tef1α*, 1.200 pb e, 1.031 pb, o amplicon de cDNA (Figura 18).

Em cultivos de 18 h não foi possível detectar a presença de transcritos dos genes *chit1* e *chi2* (Figura 18, painel A). Nos cultivos de 30 h não foi possível detectar a presença de transcritos apenas do gene *chi2*, entretanto, o gene *chit1* foi induzido pela glicose e NAcGlc em 0,1 % e não foi induzido, ou teve uma indução menor, em presença de quitina e cutícula (Figura 18, painel B).

Em 48 h, nos cultivos com glicose e com quitina o gene *chit1* teve indução de transcrição, em detrimento aos cultivos com NAcGlc 0,1% e com cutícula, nos quais, não foi possível detectar sua presença. Neste mesmo tempo de cultivo o gene *chi2* apresentou transcrição no cultivo com quitina e uma fraca transcrição em cultivo com NAcGlc 0,1% (Figura 18, painel C).

Figura 18 - Nível de transcritos dos genes *chit1* e *chi2* de *M. anisopliae*.

Cultivo de *Metarhizium* em condições de indução e repressão, em diferentes tempos: **painel A**, 18 h; **painel B**, 30 h; **painel C**, 48 h e **painel D**, 72h. RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes *chit1* e *chi2*, usando como molde a primeira fita de cDNA sintetizada a partir de RNA total extraído de culturas de *M. anisopliae* cultivados em condições de repressão e indução de expressão de quitinases. Eletroforese em gel de agarose 1,2%. As canaletas contém, respectivamente: (M) marcador de tamanho Lambda / HindIII (presente apenas o fragmento de 0,5 kb nas reações para os genes *chit1* e *chi2*, e ausente para *tefla*); (1) Controle negativo da reação sem DNA molde; (2) Amplificação utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae*; (3) Amplificação utilizando como molde o plasmídeo pZLChit1, contendo o cDNA do gene *chit1* (nas reações com os oligonucleotídeos para o gene *chit1*) ou ausência de reação para os genes *chi2* e *tefla*; e RT-PCR usando como molde primeira fita de cDNA sintetizadas a partir de RNAs isolados de *M. anisopliae*: (4) cultivado em meio mínimo suplementado com glicose 1%; (5) cultivado em meio mínimo suplementado com NAcGlc 0,1%; (6) cultivado em meio mínimo suplementado com cutícula 1%; (7) cultivado em meio mínimo suplementado com quitina 0,8%. Foi procedida a normalização da quantidade de RNA para controle interno do RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *tefla* de *M. anisopliae* que apresenta expressão constitutiva (L. Nakazato, comunicação pessoal). As setas indicam os amplicons obtidos com a RT-PCR nas reações de amplificação dos genes: *chit1* seta azul (230 pb), *chi2* seta vermelha (402 pb) e *tefla* seta marrom (1031 pb).

No experimento de 72 h de cultivo o gene *chit1* continuou apresentando transcrição em meio com glicose e ocorreu expressão em cultivo com cutícula. Níveis mais elevados de transcritos do gene *chit1* ocorreram nos cultivos com quitina e com NAcGlc 0,1%. O gene *chi2* apresentou resultados bastante similares, com exceção, do cultivo com glicose, no qual o gene *chi2* continuou com sua transcrição reprimida (Figura 18, painel C). O esquema demonstrando, de forma resumida, a regulação de transcrição dos genes *chit1* e *chi2* obtidos com os resultados da RT-PCR é mostrado na Tabela 8.

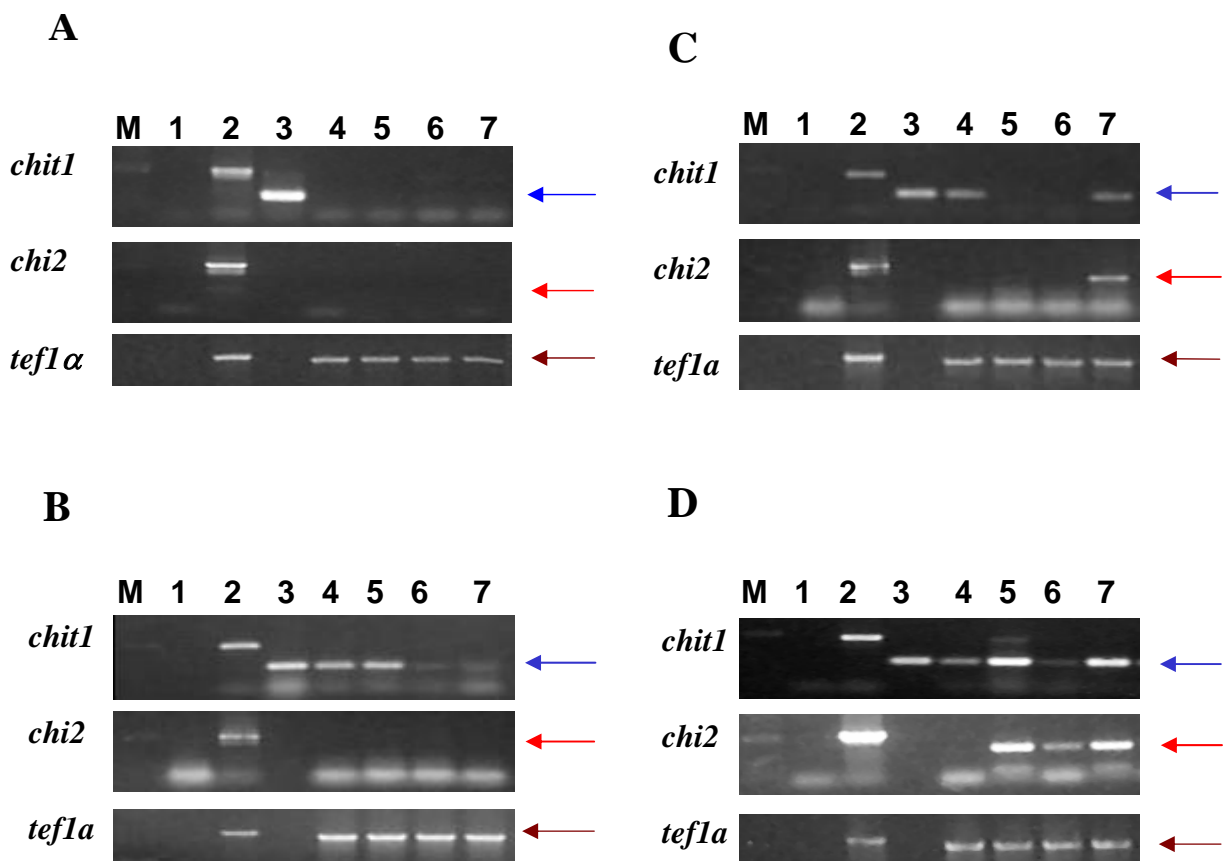


Tabela 8 – Regulação dos genes de quitinases *chit1* e *chi2* de *M. anisopliae*.

Tempo de cultivo	Fonte de Carbono	Gene <i>chit1</i>	Gene <i>chi2</i>
18 horas	Glicose	-	-
	NAcGlc 0,1%	-	-
	Cutícula	-	-
	Quitina	-	-
30 horas	Glicose	+	-
	NAcGlc 0,1%	+	-
	Cutícula	+/-	-
	Quitina	+/-	-
48 horas	Glicose	+	-
	NAcGlc 0,1%	-	+/-
	Cutícula	-	-
	Quitina	+	+
72 horas	Glicose	+	-
	NAcGlc 0,1%	++	++
	Cutícula	+/-	+
	Quitina	++	++

Os sinais representam: (+) indução, (-) sem indução, (+/-) indução fraca e (++) indução forte. Estas definições foram baseadas na intensidade aproximada das amplificações obtidas com a RT-PCR (Figura 20).

4.3 Análise das seqüências reguladoras do gene *chit1*

4.3.1 Construções da região flanqueadora 5' do gene *chit1* com a proteína repórter GFP

Para a caracterização funcional de seqüências reguladoras da região 5' do gene *chit1* de *M. anisopliae* foram construídos fragmentos de DNA contendo partes desta região, gerados por PCR, utilizando três oligonucleotídeos de orientação direta e dois de orientação reversa (BARATTO, 2001). Foram originados quatro fragmentos de DNA, um compreende a região flanqueadora 5' completa do gene *chit1*, contendo 840 pb (denominado F1), e outros três compreendendo esta região com deleções (denominados F2, F3 e F4; Figura 20, painel A). Os fragmentos de DNA amplificados foram clonados no sítio de *Sma*I do vetor pUC18 (estas construções foram denominadas de pUCF1, pUCF2, pUCF3 e pUCF4, respectivamente), e após subclonados no vetor pMETF, que possui o gene que codifica a proteína repórter eGFP (CORMACK *et al.*, 1998; BOGO, 1999; BARATTO, 2001) e marca de seleção que confere resistência ao fungicida Benomil (gene β -tubulina *ben*^R isolado de *N. crassa*; ORBACH *et al.*, 1986). Como controle positivo foi utilizada uma construção contendo o promotor do gene *tefla* de *M. anisopliae* (L. Nakazato, comunicação pessoal).

Para as transformações foram utilizados os métodos de biobalística e de PEG / protoplastização (BOGO *et al.*, 1996). Em três tentativas de transformação do fungo *M. anisopliae*, cinco possíveis transformantes foram obtidos de cada construção (pMETF1, pMETF2, pMETF3 e pMETF4). Alguns destes foram cultivados em condições de indução de expressão de quitinases (SILVA *et al.*, 2005) e analisados em microscópio de epifluorescência (item 3.7.3), entretanto, não foi possível detectar fluorescência de GFP. Por outro lado, com a análise de hibridização genômica desses transformantes utilizando como sonda a ORF do gene *egfp*, não houve sinal de hibridização. Este resultado sugere uma deficiência do sistema de transformação, principalmente com uso da marca de seleção Benomil, além disso, outros dados sugerem também a inviabilidade do uso da construção contendo a proteína repórter eGFP, por possíveis problemas desta ORF ou da construção (L. Nakazato, comunicação pessoal).

Como alternativa, foram efetuadas novas construções para a análise desta região reguladora, utilizando a ORF do gene repórter *sgfp* (FERNÁNDEZ-ÁBALOS *et al.*, 1998) e uma nova marca de seleção com o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*, que confere resistência ao fungicida glifosinato de amônio (THOMPSON *et al.*, 1987). Para isso, foram utilizadas as construções inicialmente geradas em pUC18: pUCF1 (que contém o fragmento

de DNA correspondente ao promotor completo do gene *chit1*) e pUCF2, pUCF3 e pUCF4 (que contém as deleções deste promotor). Foram utilizadas as construções que apresentaram os insertos na orientação correta, verificada por seqüenciamento (BARATTO, 2001).

Em cada construção, pUCF1, pUCF2, pUCF3 e pUCF4, foi inserido no sítio de clivagem XbaI, um cassete contendo o fragmento de DNA, compreendendo a ORF do gene repórter *sgfp* e o terminador do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (PUNT *et al.*, 1990). Para a obtenção deste fragmento, primeiramente, foi gerado um amplicon contendo a ORF do gene *sgfp* e o terminador do gene *trpC*, a partir de amplificação com os oligonucleotídeos xGFP, que apresenta um sítio de clivagem para a enzima XbaI e PUC/M13F (Tabela 5) e como DNA molde o vetor pANsGFP (Figura 19, painel A; FERNÁNDEZ-ÁBALOS *et al.*, 1998), seguindo as condições otimizadas para a amplificação (item 3.5.9.5). O amplicon obtido de aproximadamente 1,5 kb, foi purificado e clonado no vetor pUC18, no sítio de SmaI (item 3.5.5). Esta construção foi tratada com a enzima de restrição XbaI, liberando um fragmento de DNA compreendendo a ORF do gene *sgfp* e o terminador do gene *trpC* (Figura 19, painel A), que foi utilizado para as clonagens. As construções pUCF1, pUCF2, pUCF3 e pUCF4 que apresentaram estes insertos, foram seqüenciadas e aqueles insertos que apresentaram a orientação correta, de acordo com a Figura 20, painel B, tiveram inserido, no sítio PstI, o cassete contendo o promotor do gene *gpdA*, de *A. nidulans*, o gene *bar* e o terminador do gene *trpC* (L. Nakazato & C. Statts, comunicação pessoal; Figura 19, painel B). Dessa maneira, foram geradas quatro construções, diferenciadas entre si pela porção da região flanqueadora 5' do gene *chit1* nelas incluídas. O mapa físico das construções está mostrado na Figura 20 (painel B). Essas construções apresentam, respectivamente, a região 5' completa (denominado F1) ou as deleções (denominados F2, F3 e F4, Figura 20, painel A), a ORF do gene *sgfp*, o terminador do gene *trpC*, o promotor do gene *gpdA*, o gene *bar* e o terminador do gene *trpC*.

As regiões deletadas da região flanqueadora do gene *chit1* de *M. anisopliae* E₆ para a análise funcional foram selecionadas de acordo com os possíveis elementos encontrados nesta região pela análise *in silico*. Estes elementos foram identificados por comparação com elementos reguladores já descritos (BOGO, 1999; BARATTO, 2001). Além dos possíveis elementos identificados nesta região e descritos anteriormente (Figura 7; BOGO, 1999; BARATTO, 2001), a partir, de uma análise mais minuciosa (Figura 17), encontramos um possível novo elemento CREA, no sentido inverso (CCCCAC, -751) e um elemento GATA (TATC -381), também em sentido inverso, a montante do códon ATG de início de tradução. Foram identificados, ainda, na região flanqueadora 5' do gene *chit1* de *M. anisopliae* E₆ dois

possíveis elementos de consenso envolvidos na resposta ao estresse (BRUNNER *et al.*, 2003), caracterizados pelas seqüências AGGGG (-80) e CCCCT (-150).

A construção contendo F1, compreende a região flanqueadora 5' completa do gene *chit1*, contendo 840 pb (Figura 7; denominada pF1GFPBAR). Na construção contendo F2 (440pb) foi deletada a seqüência de DNA correspondente aos prováveis elementos CREA-1 e CREA-2 (denominada pF2GFPBAR). A terceira construção, contendo F3 (255pb), além de não possuir os elementos CREA, não possui também os prováveis elementos GATA-1 e GATA-2, ou seja, é composta apenas pelo provável promotor mínimo ou central (denominada pF3GFPBAR). A última construção F4 (577 pb), possui apenas os elementos que estão ausentes na construção F3 (CREA-1, CREA-2, GATA-1 e GATA-2), estando ausentes os outros prováveis elementos centrais, como os elementos *CAAT box* e *TATAAA box* (denominada pF4GFPBAR; Figura 20, painel A e B).

Para controle da transformação e da expressão de sGFP foi utilizada a construção pGFPBAR, compreendendo a sGFP sem promotor (Figura 20, painel B) e outra, obtida a partir desta construção, onde foi inserido o promotor do gene *tefla* de *M. anisopliae* fusionado a proteína repórter sGFP (denominado pTEFGFPB; L. Nakazato, comunicação pessoal), em ambas construções foi inserido o cassete contendo a marca de seleção (com a ORF do gene *bar*), utilizando a mesma estratégia citada anteriormente para a clonagem (C. Staats, comunicação pessoal).

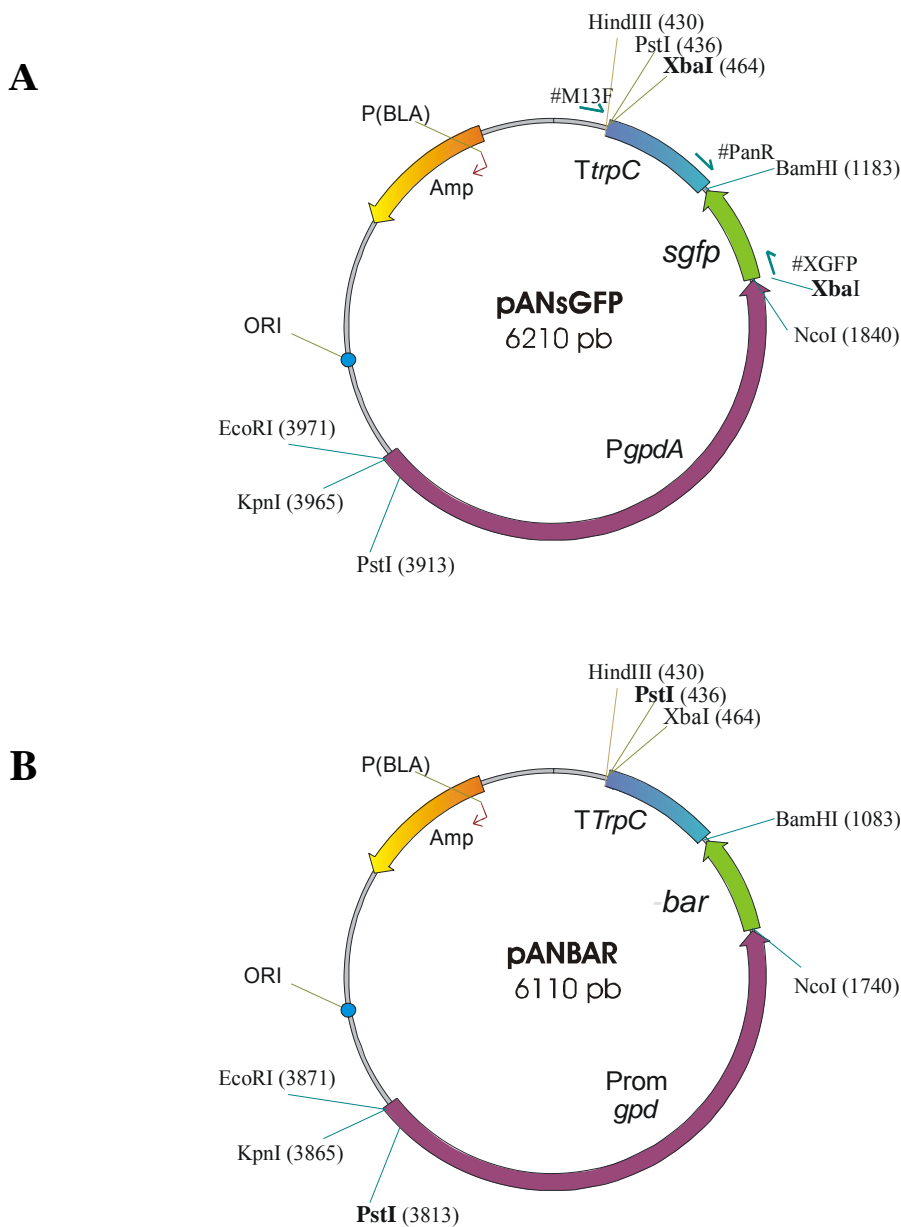
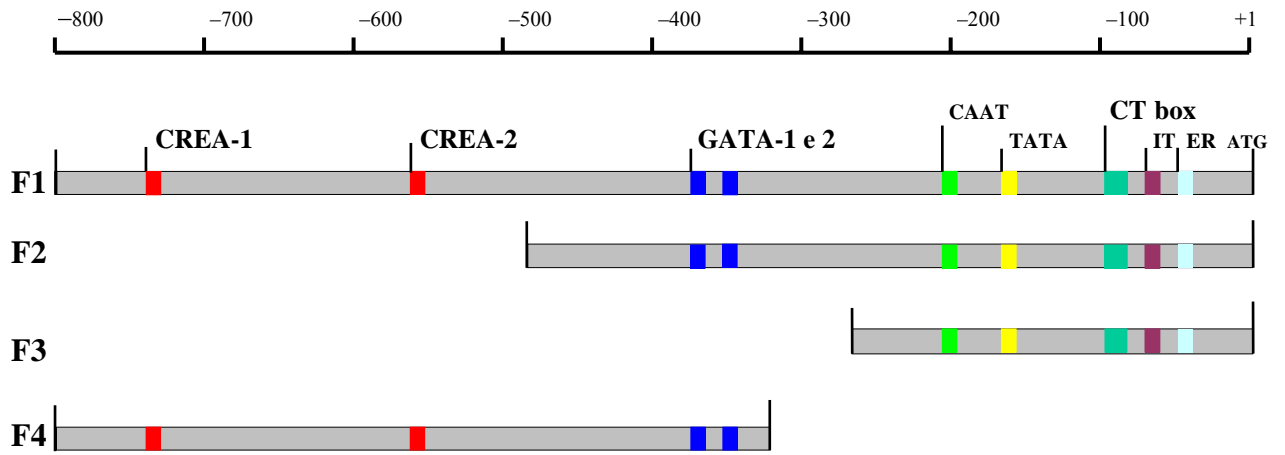
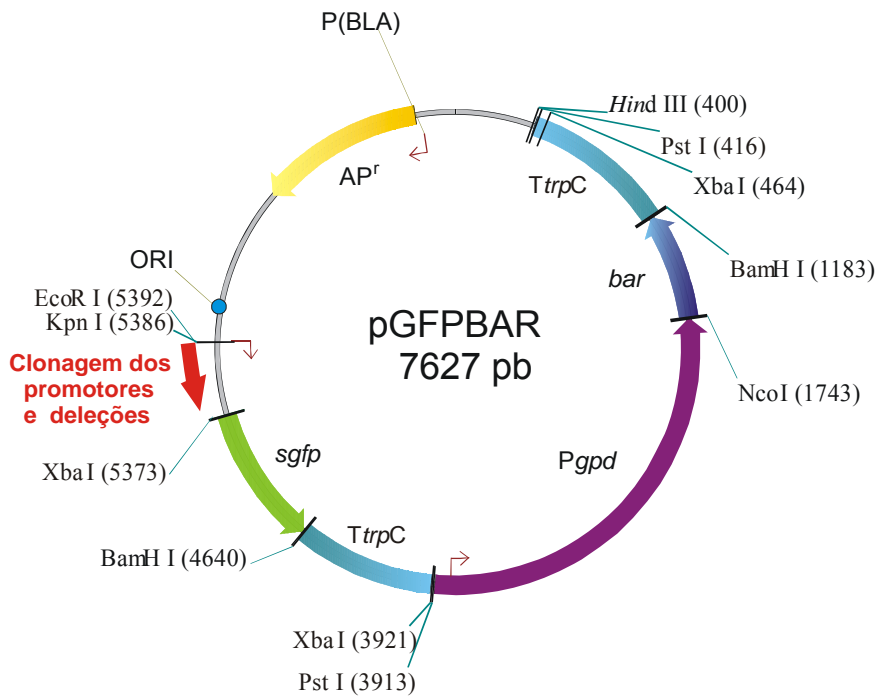


Figura 19 – Mapa físico dos plasmídeos pANsGFP (FERNÁNDEZ-ÁBALOS *et al.*, 1998) e pANBAR.

Estão representados: a marca de resistência a ampicilina (em amarelo), o cassete contendo o promotor do gene *gpdA* de *A. nidulans* (em roxo), e a ORF sGFP ou BAR (em verde) inserido nos sítios de restrição NcoI / BamHI, a região terminadora do gene *trpC* de *A. nidulans* (em azul claro) inserido nos sítios de restrição BamHI / HindIII. **Painel A**, vetor pANsGFP, estão indicadas por setas as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos M13F e xGFP, utilizados para amplificação do fragmento contendo a ORF do gene *sgfp* e o terminador do gene *trpC*; e do oligonucleotídeo panR, utilizado juntamente com xGFP, em experimentos para detecção de transformantes por PCR, que amplifica unicamente a ORF do gene *sgfp*. Estão realçados em negrito os sítios de restrição para a enzima XbaI, um presente na região 3' do terminador do gene *trpC* e o outro introduzido por sua presença no oligonucleotídeo xGFP. **Painel B**, vetor pANBAR, estão destacados em negrito os sítios para a enzima PstI, utilizados para a liberação dos insertos a serem clonados para as construções (Charley Staats, comunicação pessoal).

Figura 20 - Construções com a região flanqueadora 5' do gene *chit1* e a proteína repórter sGFP para localização de elementos regulatórios.

Painel A. Representação esquemática da região flanqueadora 5' do gene *chit1* de *M. anisopliae* (F1) e as deleções desta (F2, F3 e F3). A barra em preto representa a posição em pb. Estão representadas as posições de cada um dos possíveis elementos envolvidos na regulação da expressão do gene: CREA (em vermelho), GATA-1 e 2 (em azul), *CAAT box* (verde claro), *TATA box* (em amarelo), *CT box* (verde escuro), seqüência de início da transcrição (indicado por IT) e um provável elemento de regulação de transcrição em eucariotos (indicado por ER). O provável sítio de início de tradução ATG está representado. **Painel B.** Mapa físico do plasmídeo pGFPBAR utilizado para analisar a região 5' flanqueadora do gene *chit1*. Estão representados: a ORF do gene para resistência à ampicilina (amarelo); a região de clonagem no vetor é mostrada com a seta em vermelho; a ORF do gene *sgfp* (em verde), inserida nos sítios de restrição XbaI / BamHI; a região terminadora do gene *trpC* de *A. nidulans* (em azul claro), inserida nos sítios de restrição BamHI / XbaI. O cassete contendo o promotor do gene *gpdA* de *A. nidulans* (em roxo), a ORF do gene *bar* (em azul escuro) e a região terminadora do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (azul claro), está inserido nos sítio de PstI.

A**B**

4.3.2 Transformação de *M. anisopliae* E₆ com as construções para análise do promotor do gene *chit1* de *M. anisopliae*

As construções obtidas com a região flanqueadora 5' do gene *chit1* com a proteína repórter sGFP (BOGO, 1998; BARATTO, 2001; Figura 21) e as construções controle, foram utilizadas para a transformação de *M. anisopliae* E₆ pelo método de PEG/protoplastização (item 3.6.2). As colônias resistentes ao antifúngico glifosinato de amônio na concentração de 40 mg/ml em meio MC sólido (itens 3.4.2.2 e 3.2.2.1) foram analisadas quanto a sua estabilidade mitótica, a partir de três cultivos sucessivos em meio não seletivo e seu posterior retorno ao meio seletivo (3.6.2). Todos os transformantes com resistência ao glifosinato se mostraram estáveis. O número de transformantes obtidos para cada construção está representado na Tabela 9.

Dois transformantes obtidos com cada construção contendo diferentes regiões da sequência flanqueadora 5' foram analisados por PCR, quanto à presença no genoma da sequência da ORF *sgfp* (item 3.5.9.5). Um exemplo do resultado da PCR está mostrado na Figura 21. O resultado indica que nem todos os transformantes apresentaram a ORF do gene *sgfp*, como ocorreu com os transformantes analisados obtidos com a construção pF3GFPBAR. Baseado nos resultados obtidos com a análise por PCR um resumo dos resultados das transformações está mostrado na Tabela 9. Para confirmação da integração nos transformantes e para determinar do número de cópias inseridas, foi efetuada a análise desses transformantes por hibridização de DNA genômico, para verificarmos a presença das ORFs de *sgfp* e *bar*. A análise ficou prejudicada pela baixa qualidade do resultado dos experimentos de hibridização, o que levou à detecção de bandas de hibridização apenas nos transformantes obtidos com as construções pF1GFPBAR e pF2GFPBAR, estes com inserção de cópias múltiplas (linhas 5 e 6, respectivamente; Figura 22), e não houve identificação de bandas nítidas de hibridização nos demais transformantes, inclusive no controle positivo, transformado com pTEFGFPB (linha 3; Figura 22).

De acordo com os resultados da PCR (Tabela 9), obtivemos dois transformantes com a construção pF1GFPBAR, um com a construção pF2GFPBAR, um com pF4GFPBAR e nenhum com pF3GFPBAR. Uma análise desses transformantes foi efetuada para verificarmos a capacidade de expressão de GFP nos transformantes, frente a três meios de cultivo contendo glicose 1% ou NAcGlc 0,1% ou quitina 0,8%, incubados durante cinco dias com análises periódicas a cada 12 h. Entretanto, não foi possível detectar a presença de fluorescência a partir de análise por microscopia de fluorescência. Como controle para a detecção de fluorescência de GFP utilizamos um transformante contendo a proteína GFP expressa pelo

promotor do gene *tefla* (pTEFGFPB). Neste controle a fluorescência foi detectada em todas as condições testadas.

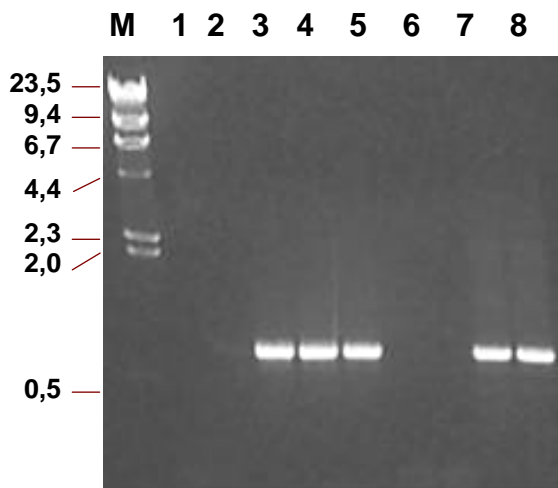


Figura 21 – Análise de transformantes resistentes ao glifosinato de amônio quanto à presença do gene repórter *sgfp*.

Reação de amplificação utilizando os oligonucleotídeos xGFP e panR (Tabela 5), que anelam nas regiões 5' do gene *egfp* e do terminador do gene *trpC* (Figura 22), levando a amplificação de um fragmento de 750 pb. Gel de agarose 0,8%. Canaletas: (M) marcador de tamanho Lambda / HindIII, número indicado à esquerda em kb; (1) controle negativo da reação sem DNA molde; (2) PCR utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae* selvagem; PCR utilizando como molde DNA dos transformantes obtidos com as construções: (3) pTEFGFPB; (4) pF1GFPBAR; (5) pF2GFPBAR; (6) pF3GFPBAR; (7) pF4GFPBAR; (8) PCR utilizando como molde a construção plasmidial pPANsGFP.

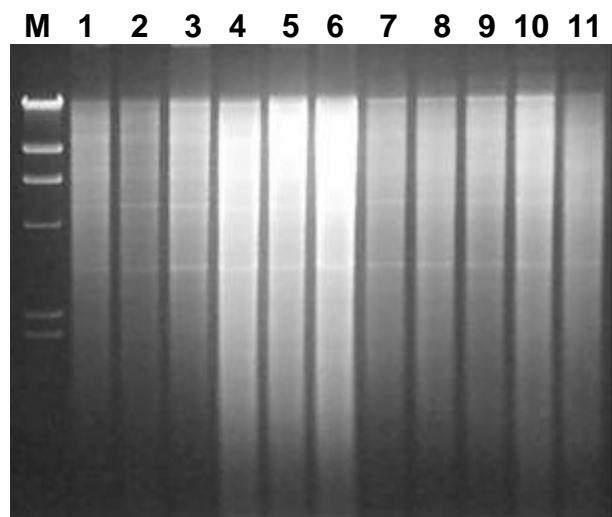
Tabela 9 - Resumo dos resultados obtidos com a transformação de *M. anisopliae* para análise de promotor.

Construções	Nº de transformantes	Transformantes analisados	Transformantes confirmados por PCR
pF1GFPBAR	2	2	2
pF2GFPBAR	3	2	1
pF3GFPBAR	3	2	0
pF4GFPBAR	5	2	1
pGFPBAR	2	1	1
pTEFGFPB	1	1	1

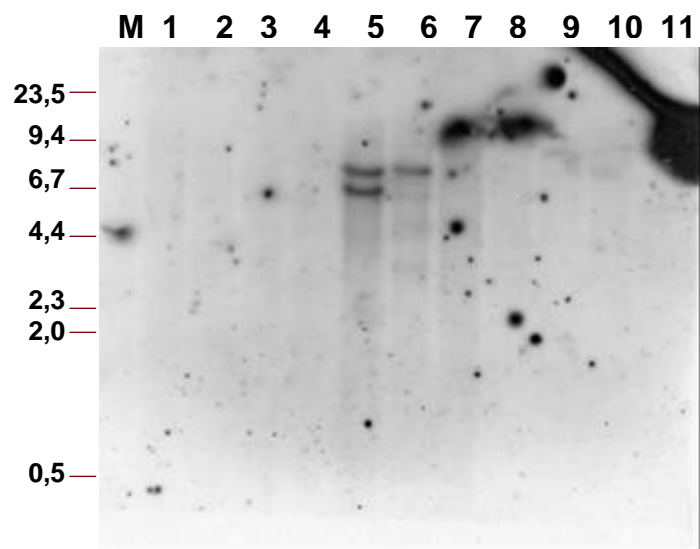
Figura 22 – Verificação por hibridização dos transformantes de *M. anisopliae* para análise de promotor.

Hibridização de DNA genômico de transformantes de *M. anisopliae* resistentes ao antifúngico glifosinato de amônio. **Painel A**, eletroforese em gel de agarose 0,8% de μg de DNA por amostra. **Painel B**, Auto-radiografia da membrana hibridizada, utilizando como sonda o gene *bar*. **Painel C**, Auto-radiografia da membrana hibridizada, utilizando como sonda o gene *egfp*. Canaletas: (M) marcador de tamanho molecular Lambda / HindIII, número indicado à esquerda em kb; (1) DNA genômico de *M. anisopliae* E₆ digerido com a enzima de restrição EcoRI; DNA genômico das colônias de *M. anisopliae* resistentes ao glifosinato de amônio digeridos com enzima de restrição EcoRI, transformados com as construções: (2) pGFPBAR; (3) pTEFGFPB; (4) e (5) pF1GFPBAR; (6) e (7) pF2GFPBAR; (8) e (9) pF3GFPBAR; (10) e (11) pF4GFPBAR.

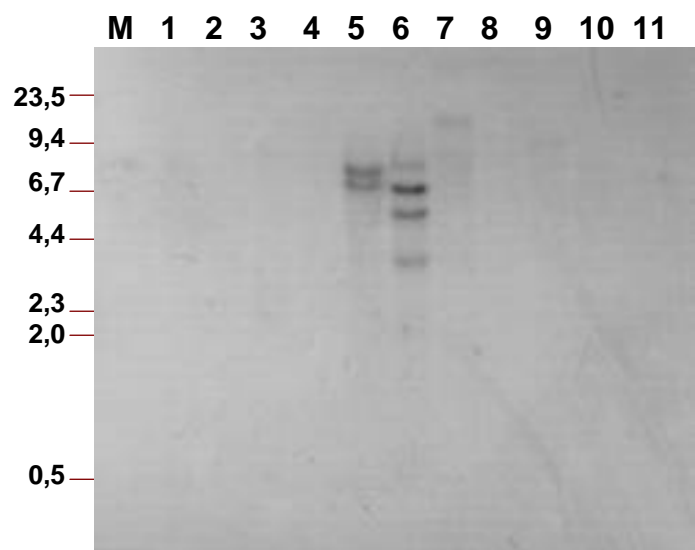
A



B (*gene bar*)



C (*gene egfp*)



4.4 Superexpressão do gene *chit1* em *M. anisopliae*

4.4.1 Obtenção de construções para a superexpressão do gene *chit1*

Para a superexpressão da quitinase CHIT42, foram efetuados experimentos de transformação de *M. anisopliae* E₆ com a construção plasmidial pANChit1 (BARATTO, 2001). Esta construção é oriunda do vetor pAN52.1B que contém o promotor constitutivo do gene *gpdA* e o terminador do gene *trpC*, ambos de *A. nidulans* (PUNT *et al.*, 1990), no qual, foi inserido o gene *chit1* de *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998; BARATTO, 2001).

M. anisopliae foi co-transformado com a construção pANChit1 e com o vetor pBT6, que possui a marca de seleção que confere resistência ao fungicida benomil (gene β -tubulina *ben*^R isolado de *N. crassa*; ORBACH *et al.*, 1986). Para as transformações foram utilizados os métodos de biobalística e de PEG / protoplastização (BOGO *et al.*, 1996).

Em torno de vinte possíveis transformantes que apresentaram resistência a benomil foram analisados quanto à presença de novas cópias do gene *chit1* por hibridização, utilizando o gene *chit1* como sonda e por PCR utilizando os oligonucleotídeos *chit1F* e *chit1R* (item 3.5.9.1). Os resultados indicaram que não houve inserção do cDNA de *chit1*, corroborando com a deficiência no sistema de transformação com a marca de seleção Benomil como observado anteriormente, onde utilizamos este sistema de transformação.

Alternativamente, outra marca de seleção foi empregada, utilizando o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (THOMPSON *et al.*, 1987), que confere resistência ao glifosinato de amônio. Para a transformação da construção pANChit1 (BARATTO, 2001) em *M. anisopliae*, foram efetuados experimentos de co-transformação com o vetor pANBAR, que tem como marca de seleção o gene *bar* sob o controle do promotor *gpdA* de *A. nidulans* (STAATS, 2003; Charley Staats, comunicação pessoal; Figura 19, painel B). O método de transformação empregado foi o de protoplastização/PEG, utilizando a proporção do vetor a ser inserido em relação ao vetor contendo a marca de seleção de 5 : 1.

Trinta colônias resistentes ao glifosinato de amônio foram obtidas e estas tiveram seu DNA genômico extraído (item 3.5.2) e analisado quanto à presença do cDNA do gene *chit1* utilizando PCR (item 3.5.9.1). Foram utilizados os oligonucleotídeos *chit1F* e *chit1R* (Tabela 5), derivados da seqüência do gene *chit1* de *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998) e que flanqueiam os três *introns* deste gene, permitindo assim a distinção entre a cópia genômica (472 pb) do gene e a cópia de cDNA (230 pb) presente na construção pANChit1. Entretanto, novamente não obtivemos resultados positivos na co-transformação.

Por outro lado, a inserção do cassete contendo a marca de seleção com o gene *bar* no vetor pANChit1, demonstrou-se inviável pelas dificuldades da sua clonagem, devido a incompatibilidade entre os sítios de restrições do vetor com o inserto. Desta maneira, uma nova construção foi efetuada para a expressão do gene *chit1*, utilizando o promotor constitutivo *tefla* de *M. anisopliae*, que apresentou boa eficiência na expressão da GFP (Luciano Nakazato, comunicação pessoal) e como marca de seleção a resistência ao Glifosinato de amônio.

A construção foi realizada partindo do vetor pUC18 onde foram clonados o promotor *tefla* de *M. anisopliae*, entre os sítios de restrição de EcoRI e KpnI e o terminador do gene *trpC* de *A. nidulans*, clonado entre os sítios BamHI e PstI (Luciano Nakazato, comunicação pessoal; Figura 23). No sítio de restrição de PstI deste vetor foi clonado o fragmento de DNA de 3,3 kb, contendo o cassete com a marca de resistência para o glifosinato de amônio (gene *bar*) sob controle do promotor do gene *gpdA* e terminador do gene *trpC* (Figura 19, painel B). Nesta construção, denominada pTEFBAR, no sítio de restrição SmaI, foi introduzido o cDNA do gene *chit1*. No total, seis clones com o inserto desejado foram obtidos de mil colônias testadas (item 3.5.7). Como a reação de ligação foi com extremidades cegas, as construções foram obtidas contendo o gene *chit1* inserido nas duas orientações, senso e antisenso (1:1). A orientação do gene *chit1*, no vetor para expressão, foi determinada por uma reação de clivagem com a enzima EcoRV, visto que, um sítio está presente próximo a extremidade 3' do promotor *tefla* e outro, próximo a extremidade 5' do gene *chit1*, desta forma liberando um fragmento de aproximadamente 450 pb, no sentido correto ou senso, e um fragmento de 1,7 kb, na forma invertida ou antisenso (Figura 24). Os dois tipos de construções foram utilizados nos experimentos de transformação (item 3.6.2) para a superexpressão (pTEFCHIT1) e para ensaios de inibição da tradução com a construção contendo o gene *chit1* antisenso (pCHIT1ANTI).

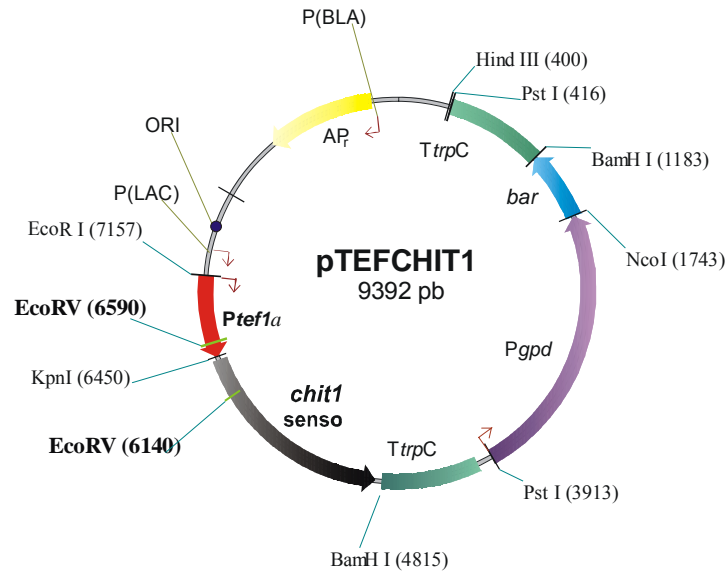
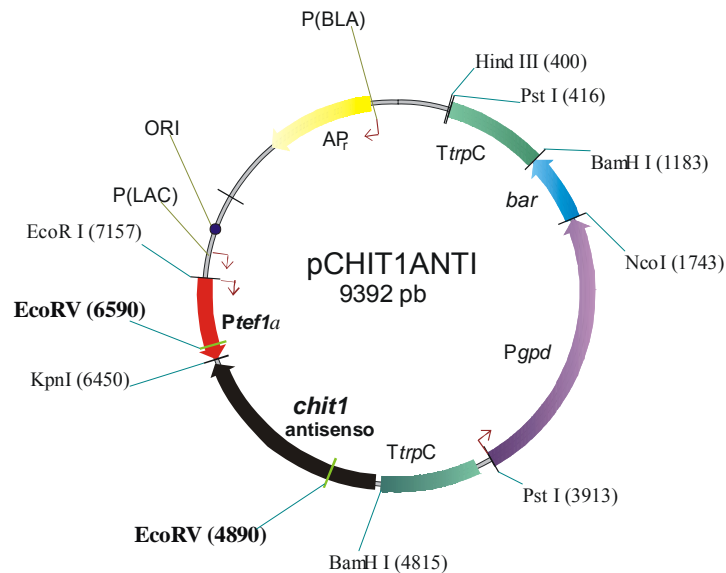
A**B**

Figura 23 – Mapa físico dos plasmídeos pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI.

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

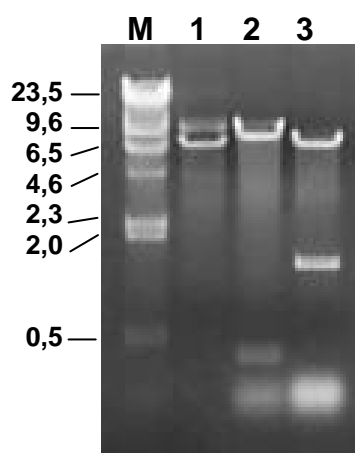


Figura 24 – Clonagem do gene *chit1* no vetor pTEFBAR.

Clivagem de construções obtidas a partir da clonagem do gene *chit1* no vetor para superexpressão pTEFBAR. Gel de agarose 0,8%. Canaletas: (M) marcador de tamanho Lambda / HindIII, os números indicados à esquerda representam o tamanho em kb; (1) clivagem do DNA do vetor pTEFBAR com a enzima de restrição EcoRV; (2) e clivagem de um clone positivo com gene *chit1* no sentido direto (pTEFCHIT1B); (3) e de um antisenso (pTEFCHIBI), com a enzima de restrição EcoRV.

4.4.2 Transformação de *M. anisopliae* E₆ com as construções para superexpressão do gene *chit1* de *M. anisopliae*

M. anisopliae E₆ foi transformado com as duas construções obtidas, pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI, e a construção controle, pTEFBAR (com a marca de seleção BAR e sem o gene *chit1*), pelo método de PEG / protoplastização (item 3.6.2). As colônias resistentes ao antifúngico glifosinato de amônio na concentração de 40 mg/ml foram analisadas quanto a sua estabilidade mitótica, como descrito anteriormente (item 4.4.2). Da mesma maneira, todos os transformantes se mostraram estáveis quanto à resistência ao glifosinato. O número de transformantes obtidos com cada construção está representado na Tabela 10.

Dois transformantes obtidos com as construções pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI e um de cada controle pTEFBAR (presente trabalho) e pTEFGFPB (com o gene *sgfp* sob regulação do promotor de *tefla* e com a marca de seleção BAR; L. Nakazato, comunicação pessoal), foram analisados por PCR (item 3.5.9.1) utilizando os oligonucleotídeos *chit1F* e *chit1R* (Tabela 5), derivados da seqüência do gene *chit1* e cujos amplicons podem diferenciar entre a cópia selvagem do gene e a cópia do cDNA transformada. O resultado indica que apenas um dos

potencias transformantes não contém a cópia do cDNA do gene *chit1*. Um exemplo do resultado da amplificação está mostrado na Figura 25.

Os transformantes Tchit1.1 e Tchit1.2 obtidos com a construção pTEFCHIT1 (gene *chit1* na direção senso; canaletas 4 e 5, Figura 25), apresentaram a inserção da cópia de cDNA, sendo mantida a cópia selvagem. Resultado semelhante foi obtido com o transformante Tchit1Anti, obtido com a construção pCHIT1ANTI (com o gene *chit1* na direção antisense; canaleta 5, Figura 25). Entretanto, o outro transformante obtido com esta construção (canaleta 6), não apresentou inserção da cópia de cDNA, apresentando o mesmo amplicon que os controles, a linhagem selvagem (canaleta 3) e o transformante Ttefbar, obtido com a construção pTEFBAR (canaleta 8), que não possui o cDNA de *chit1*.

Estes transformantes foram também analisados por hibridização com DNA genômico, para verificarmos a presença do gene *bar* e confirmar a sua integração, e ainda, para estimarmos o número de cópias do gene *chit1* inserido (Figura 26). O DNA dos transformantes e dos controles analisados foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI. Utilizando o gene *bar* como sonda, foi possível observar a presença de pelo menos uma banda de hibridização em cada DNA de transformante, com exceção do transformante Tchit1.2, obtido com a construção pTEFCHIT1 (canaleta 4; Tabela 10 Figura 26, painel B). Neste transformante pelo menos quatro bandas de hibridização podem ser visualizadas. Por outro lado, em um dos transformantes com a construção pCHIT1ANTI (Figura 26, painel B; canaleta 6), não ocorreu banda de hibridização, indicando ser um falso transformante.

Quando utilizamos o gene *chit1* como sonda o transformante Tchit1.1, obtido com a construção pTEFCHIT1 (canaleta 3; Figura 26, painel C) apresentou pelo menos duas bandas de hibridização, ambas, de tamanhos diferentes do padrão de hibridização da linhagem selvagem, indicando que houve inserção de mais de uma cópia da construção, já o transformante Tchit1.2, também obtido com a construção pTEFCHIT1 (canaleta 4; Figura 26, painel C), a exemplo de quando utilizamos *bar* como sonda, apresentou pelo menos quatro cópias.

O transformante Tchit1Anti, obtido com a construção pCHIT1ANTI (canaleta 5) apresentou duas bandas de hibridização, confirmando a inserção de uma cópia da construção cotendo o gene *chit1*. Os controles Ttefbar e Tsgfp (obtidos com as construções pTEFBAR e pTEFGFPB, respectivamente; canaletas 2 e 7), apresentaram apenas a banda de hibridização correspondente ao gene *chit1* selvagem, a exemplo do transformante obtido com a construção pCHIT1ANTI (Figura 26, painel C; canaleta 6), que confirmou ser um falso transformante, como observado anteriormente. Um resumo desses resultados está apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Resumo dos resultados das transformações das construções para superexpressão do gene *chit1* para *M. anisopliae*.

Construção	Nº de possíveis transformantes obtidos	Resistentes que foram analisados	Resistentes que confirmaram ser transformantes	Denominação dos transformantes
pTEFCHIT1	7	2	2	Tchit1.1 e Tchit1.2
pCHIT1ANTI	2	2	1	Tchit1Anti
pTEFBAR	1	1	1	Ttefbar
pTEFGFPB	1	1	1	Tsgfp

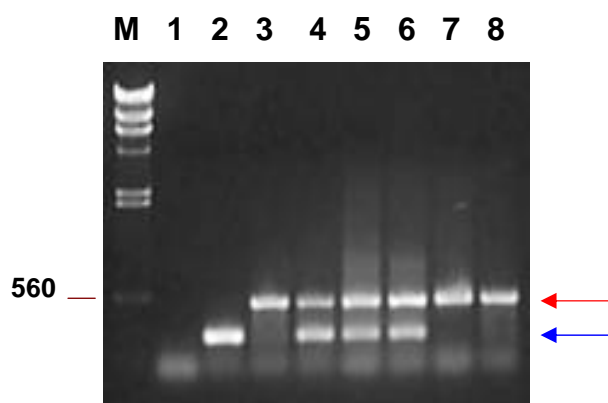


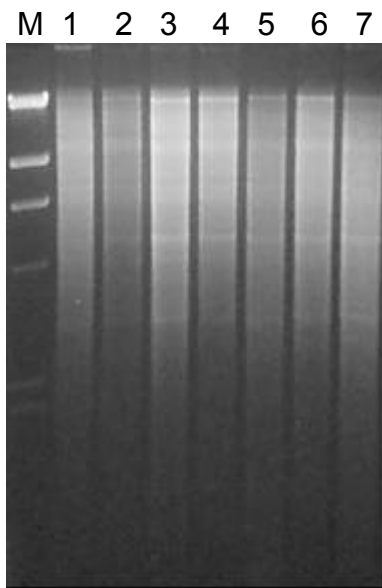
Figura 25 – Análise de transformantes resistentes ao glifosinato quanto à presença do cDNA do gene *chit1*.

Reação de amplificação utilizando os oligonucleotídeos *chit1F* e *chit1R* (item 3.5.9.1). O amplicon gerado a partir do gene *chit1* selvagem apresenta 472 pb (seta vermelha) e o amplicon gerado a partir do cDNA do gene *chit1* (construções pTEFCHIT1 e pCHIT1ANTI) apresenta 230 pb (seta azul). Gel de agarose 0,8%. Canaletas: (M) marcador de tamanho Lambda / HindIII, o número indicado à esquerda representa o fragmento de 560 pb; canaletas (1) controle negativo da reação sem DNA molde; (2) PCR utilizando como DNA molde o vetor pANChit1, que possui o cDNA do gene *chit1*; (3) PCR utilizando como molde DNA genômico de *M. anisopliae* selvagem; PCRs utilizando como molde DNA genômico de prováveis transformantes de *M. anisopliae* que apresentaram resistência ao fungicida glifosinato de amônio: (4) e (5) construção pTEFCHIT1 (gene *chit1* na orientação senso); (6) e (7) construção pCHIT1ANTI (gene *chit1* antisenso); (8) pTEFBAR.

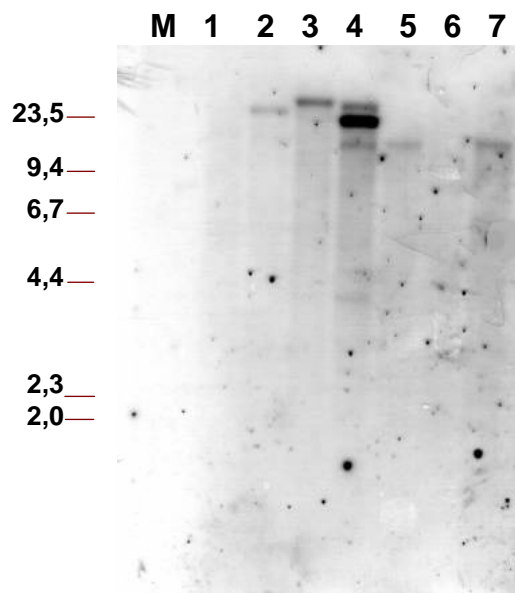
Figura 26 – Análise por hibridização dos transformantes de *M. anisopliae* para superexpressão do gene *chit1*.

Hibridização de DNA genômico de transformantes de *M. anisopliae* resistentes ao antifúngico Glifosinato de amônio, transformados com a construção para superexpressão do gene *chit1* (*chit1* senso) e com a construção com o gene *chit1* invertido (*chit1* antisenso). **Painel A**, eletroforese em gel de agarose 0,8%. **Painel B**, Auto-radiografia da membrana hibridizada, utilizando como sonda a ORF do gene *bar*. **Painel C**, Auto-radiografia da membrana hibridizada, utilizando como sonda a ORF do gene *chit1*. Canaletas: (M) Lambda / HindIII; (1) DNA genômico de *M. anisopliae* linhagem E₆ selvagem digerido com a enzima de restrição EcoRI; DNA genômico das colônias de *M. anisopliae* resistentes ao glifosinato de amônio digeridos com enzima de restrição EcoRI, transformados com as construções: (2) pTEFBAR; (3) e (4) pTEFCHIT1 (gene *chit1* senso); (5) e (6) pCHIT1ANTI (gene *chit1* antisenso); e (7) pTEFGFPB.

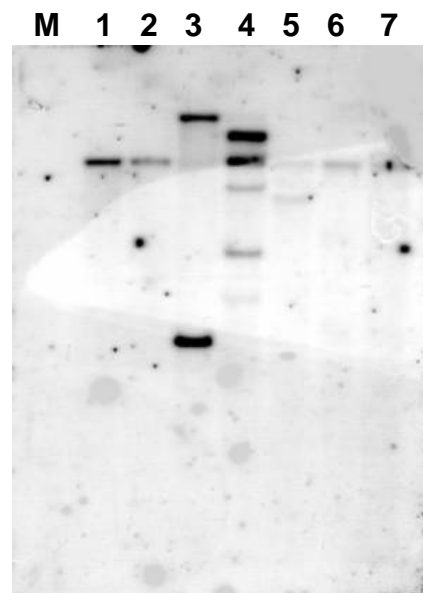
A



B
gene *bar*



C
gene *chit1*



4.4.3 Análise da produção de quitinases dos transformantes contendo a construção para a superexpressão do gene *chit1*.

M. anisopliae E6 (selvagem) e os transformantes denominados, respectivamente: Ttefbar (obtido com a construção pTEFBAR, sem o gene *chit1*), Tchit1.1 e Tchit1.2 (obtidos com a construção pTEFCHIT1, gene *chit1* senso) e Tchit1Anti (obtido com a construção pCHIT1ANTI, gene *chit1* antisense; Tabela 10), foram analisados quanto à produção de quitinase em sobrenadantes de culturas por ensaios enzimáticos (item 3.7), como mostrado na Tabela 11. A linhagem selvagem de *M. anisopliae* e os transformantes foram cultivados durante 48 h e 72 h, em meio de cultivo líquido MC, contendo 1% de glicose, que foi suplementada a cada 24 h (itens 3.2.2.1 e 3.3.2.1). Os sobrenadantes de culturas dos transformantes apresentaram um aumento significativo na atividade de quitinase, em torno de 5,5 vezes para o transformante Tchit1.1 e 3,5 para o transformante Tchit1.2 (cultivos de 48 h) e 7,3 vezes para Tchit1.1 e 6,0 para Tchit1.2 (cultivos de 72h), em relação aos controles (selvagem e o transformante Ttefbar). Com o transformante Tchit1Anti, obtido com a construção contendo o *chit1* antisense, foi possível observar uma diminuição na atividade quitinolítica, de até 30% e de 40%, em cultivos de 48 e 72 h, respectivamente. Os ensaios enzimáticos foram efetuados em triplicatas e estão representadas as médias (Tabela 11).

A condição de cultivo com glicose, esta adicionada a cada 24 h, leva a uma repressão do sistema quitinolítico (MORAES *et al.*, 2000; BARRETO *et al.*, 2004), o que permite a melhor observação e detecção da diferença da atividade de quitinase nos transformantes para superexpressão da quitinase CHIT42 em relação aos seus controles, pois o selvagem e o transformante com a construção sem o gene *chit1*, possuem apenas o gene *chit1* com seu promotor original e deverão ter a produção de quitinase limitada por esta regulação. Entretanto, nos transformantes com cópias extras do gene *chit1* sob controle do promotor do gene *Tef1 α* , que é constitutivo e insensível a repressão por glicose, portanto, o produto do cDNA será expresso normalmente e ocorrendo assim maior expressão e atividade de quitinase nos sobrenadantes.

Por outro lado, o cultivo contendo glicose permite que haja uma possível expressão do gene *chit1* selvagem, como observado nos resultados de RT-PCR (item 4.3), com provável produção da quitinase CHIT42. Dessa maneira, permitindo a observação da redução da secreção de quitinase, no transformante com o gene *chit1* antisense. Para o ensaio enzimático foi utilizado como substrato quitina coloidal, que é o substrato preferencial para endoquitinases, esta atividade é demonstrada pela quitinase CHIT42 codificada pelo gene *chit1* (BARATTO *et al.*, 2003).

Tabela 11 – Atividade de quitinase dos transformantes superexpressando o gene *chit1* ou contendo o gene *chit1* antisenso.

Linhagens	Atividade específica (GlcNAc $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	48 h	72 h
Selvagem (E ₆)	0,111 \pm 0,010 ^b	0,088 \pm 0,010 ^b
Ttefbar	0,115 \pm 0,012 ^b	0,090 \pm 0,008 ^b
Tchit1.1	0,616 \pm 0,028 ^{d,e}	0,660 \pm 0,052 ^e
Tchit1.2	0,374 \pm 0,023 ^c	0,545 \pm 0,042 ^d
Tchit1Anti	0,060 \pm 0,010 ^a	0,045 \pm 0,020 ^a

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a partir dos dados analisados pelo teste ANOVA – Duncan ($\alpha=0,05$).

5 - DISCUSSÃO

O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* se destaca por sua capacidade de infectar um amplo espectro de hospedeiros, incluindo insetos e ácaros, e serve como um importante modelo para estudo de biologia molecular, regulação metabólica, regulação gênica e desenvolvimento (MELO & AZEVEDO, 1998; ALVES, 1998).

Os fungos filamentosos possuem microfibrilas de quitina como um dos principais componentes estruturais da parede celular (CABIB, 1989; GOODAY *et al.*, 1992). Assim, as quitinases podem ser essenciais em processos fisiológicos e morfogenéticos que requerem a digestão da parede celular, como germinação, crescimento apical, ramificações e autólices das hifas, dispersão de esporos e nutrição (BARTNICK-GARCIA, 1973, GOODAY, 1990; GOODAY, *et al.*, 1992). Essas enzimas estão, provavelmente, envolvidas no alongamento das hifas, segundo a teoria de BARTINICKI-GARCIA (1968), onde seriam necessárias para a formação de espaços e a inserção de material novo na parede celular, ou seja, o desenvolvimento das hifas por um equilíbrio entre síntese, pelas quitina-sintases, e degradação, pelas quitinases. Isto garantiria flexibilidade suficiente para o crescimento apical das hifas.

As microfibrilas de quitina também são um dos componentes majoritários da cutícula de artrópodes, representando uma barreira potencial à penetração de fungos patogênicos (GOODAY, *et al.*, 1992) e há fortes evidências de que as quitinases, juntamente com outras enzimas, também desempenham uma função importante no processo de infecção (ST. LEGER *et al.*, 1986b), com o seu envolvimento na degradação da cutícula do hospedeiro. A hidrólise completa da quitina leva à liberação de monômeros de N-acetilglicosamina (NAcGlc), servindo para a nutrição do fungo (ST. LEGER *et al.*, 1986b; PATIL *et al.*, 2000). Para essas diferentes funções, os fungos entomopatogênicos, entre os quais se destaca *M. anisopliae*, apresentam uma complexidade de isoenzimas quitinolíticas: N-acetilglicosaminidases, com expressão constitutiva (ST. LEGUER *et al.*, 1991b) e as exoquitinases e endoquitinases que são altamente reguladas, conferindo a capacidade do organismo explorar com eficiência o meio, obtendo os nutrientes necessários para o seu crescimento e regulá-lo, evitando interferências entre os processos (ST. LEGER *et al.*, 1986b; 1991b;1996b; PINTO *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 1999; HENRISSAT, 1999).

É necessário, portanto, obter e ampliar os conhecimentos sobre a função das quitinases e seu sistema de regulação da expressão, pois, além do interesse científico, servindo como

modelo de estudo para fungos filamentosos e eucariotos, é um requisito importante para o melhoramento de linhagens e sua aplicação com maior eficiência no controle biológico. Uma importante abordagem é a identificação e a clonagem de genes que codificam para estas quitinases, análise de sua regulação de transcrição, análise da função de elementos reguladores encontrados na região promotora e determinação da função dessa quitinase no organismo, que são ferramentas básicas e informações indispensáveis para a sua utilização na obtenção de organismos geneticamente modificados com maior poder de patogenicidade sobre os hospedeiros.

O presente trabalho soma esforços para viabilizar estudos que solucionem questões que ainda persistem envolvendo as quitinases presentes em *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆, com a clonagem e a caracterização de um novo gene, comprovação de sua presença, determinação de sua regulação juntamente com outro gene de quitinase, a obtenção de construções para transformação no organismo, com a estratégia de superexpressão e de análise da região reguladora, que auxiliem na comprovação da participação desta quitinase durante etapas da morfogênese ou na infecção de seus hospedeiros.

A linhagem E₆, utilizada neste trabalho, foi escolhida por apresentar uma maior secreção de quitinases (BARRETO *et al.*, 2004) e ser a mais infectiva dentre as linhagens testadas no modelo biológico do carrapato *Boophilus microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000).

Visando ao estudo e análise de um gene com potencial influência na virulência de *M. anisopliae*, o gene *chi2* teve sua seqüência isolada e caracterizada. Além do seu possível envolvimento na patogenicidade, este gene, foi pouco estudado e apenas parte da sua seqüência de cDNA era conhecida (FREIMOSER *et al.*, 2003; numero de acesso AJ293217).

Foi isolado e seqüenciado o gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* E6 utilizando uma técnica não muito usual, principalmente, quando se possui em mãos bancos de cDNA e genômico do organismo. Entretanto, por motivos não-claros, foi observado, que apesar do número de clones analisados serem representativos (80.000 clones de um banco genômico e 100.000 clones de um banco de cDNA), não foi possível detectar a sequencia de interesse correspondente ao gene. Desta maneira, como técnica alternativa, foi construído um banco subgenômico, no vetor pUC18, do qual, foi obtido um clone com aproximadamente 5,3 kb onde estava presente o gene *chi2* na região 3' do inserto.

A análise comparativa da seqüência do gene *chi2* clonado, com a seqüência publicada por FREIMOSER e colaboradores (2003) e a seqüência parcial obtida por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos que flanqueavam a região do primeiro íntron, permitiu determinar a presença de dois íntrons, com 210 pb e 75 pb, respectivamente. Foi observado,

que, além dos íntrons estarem em posições diferentes em relação a íntrons de quitinases de fungos filamentosos, incluindo o gene *chit1* isolado de *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998; KUPFER *et al.*, 2004), o segundo íntron não apresentou todas as seqüências canônicas tipicamente encontradas em fungos (BALLANCE, 1986). A partir da análise de seqüências de fungos filamentosos e leveduras, KUPFER e colaboradores (2004), revelaram que mais de 98 % dos íntrons desses organismos apresentaram os sítios de processamento conservados 5'GT e 3'AG. e as seqüências internas canônicas próximas à região 3' do íntron CTAAC, CTGAC ou CTAAT (encontrados no 1, 2º e 3º íntron, respectivamente), são característicos de fungos (BALLANCE, 1986). Entretanto, o segundo íntron de 75 pb, apesar de apresentar os sítios de processamento das regiões flangeadoras esperada 5' GT e 3' AG, não apresentou a seqüência interna conservada, próxima à região 3', CTGAC típica de segundo íntron (BALLANCE, 1986).

Até o momento, a seqüência do gene *chit1* era a única seqüência gênica completa de uma quitinase determinada em *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998). O gene *chit1* apresentou o códon de início de tradução a 56 pb a jusante do provável início de transcrição, enquanto o códon de início de tradução encontrado no gene *chi2*, está a 96 pb do primeiro nucleotídeo de início de transcrição (G+1). Entretanto, como foi encontrado outro códon ATG na região UTR (a 53 pb do início da transcrição), mesmo que fora da fase de leitura, pode ser necessário a confirmação do códon correto de início de tradução experimentalmente.

O gene *chi2* codifica para uma provável proenzima de aproximadamente 44 kDa, entretanto, os 19 primeiros aminoácidos demonstraram característica de peptídeo-sinal, sendo que o 19º aminoácido (V¹⁹) apresenta-se como sítio de clivagem para maturação de proteínas, o que implica em uma enzima madura de aproximadamente 42kDa. Esta abordagem, aparentemente, possui grande relevância, pois o gene *chit1* de *M. anisopliae*, que codifica para uma proenzima de 45 kDa, teve sua seqüência codificadora correspondente à enzima madura expressa de forma heteróloga em *E. coli* e esta quitinase, a CHIT42, apresentou-se de forma ativa (BARATTO *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que o gene *chit1* e o gene *chi2*, codificam duas quitinases deduzidas de massas moleculares similares, próximas a 42 kDa, apesar dos pI teóricos serem diferentes, 5.9 e 4.8, respectivamente, refletindo a alta complexidade do sistema quitinolítico de *M. anisopliae*. Até o momento, nenhuma das quitinases purificadas de *M. anisopliae* apresentou a seqüência de aminoácido, pI ou massa molecular que indicassem que fossem codificadas pelo gene *chi2*, corroborando a importância desse estudo para o aprofundamento com trabalhos posteriores para o esclarecimento da função da quitinase

codificada pelo gene. A dificuldade na purificação desta quitinase pode estar relacionada com sua alta regulação e sua baixa expressão.

Análises de hibridização do gene clonado com DNA genômico de *M. anisopliae* E₆ sugerem que existe apenas uma cópia do gene *chi2* no genoma. Outros dois genes caracterizados nesta mesma linhagem, gene *chit1* e gene *chi3*, também estão presentes em cópia única no genoma.

A partir da análise da seqüência de aminoácidos deduzida a partir do gene *chi2* foram identificadas as seqüências de consenso SXGG, que correspondem ao sítio de ligação à quitina (ORIKOSHI *et al.*, 2003); os resíduos conservados de cisteína que auxiliam no dobramento do domínio catalítico; e o domínio catalítico, com a seqüência NGFDFDIE. Entretanto, esta apresentou uma alteração no primeiro aminoácido, de D→N, em relação à seqüência de consenso de quitinases de fungos pertencentes à família 18 das glicosil-hidrolases, DxxDxDxE, que é altamente conservada (ORIKOSHI *et al.*, 2003).

A alteração no domínio catalítico pode ser crítica, pois trata da substituição do aminoácido ácido glutâmico, com carga negativa, para uma asparagina, aminoácido não-carregado. Em um trabalho de mutagênese dirigida, WATANABE e colaboradores (1993), demonstraram evidências de que resíduos de ácido glutâmico e aspártico são importantes para a catálise de reações mediadas por quitinases em bactérias. Portanto, é necessário estudar a partir da caracterização da proteína selvagem e da sua comparação com a proteína heteróloga com mutações sítio dirigidas, visto que se trata de uma característica ímpar nesse grupo de quitinases.

Outra característica marcante da seqüência de aminoácidos deduzida a partir do gene *chi2* foi a presença, na região C-terminal, de um domínio de ligação à celulose (CBD; *cellulose binding domain*), bastante peculiar de fungos, que se caracteriza por quatro cisteínas distribuída de forma bastante conservada nestes organismos (GOLDSTEIN *et al.*, 1993). Além das celulasas, este domínio também foi identificado em outras enzimas degradadoras de polissacarídeos, como xilanase e manase (BÉGUIN & AUBERT, 1994). A presença de CBD é uma característica única da quitinase CHI2, deduzida do gene *chi2* de *M. anisopliae* (presente trabalho; FREIMOSER *et al.*, 2003), pois não foi encontrada nos seus prováveis ortólogos (Figura 14). Em *Trichoderma virens*, foi isolado um gene, que codifica uma proteína predita de 33kDa, o gene apresentou um domínio de ligação à celulose, também na região C-terminal e semelhante ao domínio predito pela quitinase CHI2 (KIM *et al.*, 2002), representando os únicos casos descritos na literatura. LIMÓN e colaboradores (2004) inseriram nas quitinases Chit42 e Chit33 do micoparásita *T. harzianum* um domínio de ligação à celulose (CBD), visto

que, nestas enzimas falta o domínio de ligação à quitina. As enzimas heterólogas apresentaram uma capacidade de ligação à quitina e uma atividade quitinolítica aumentada em relação às enzimas selvagens, e uma atividade antifúngica igualmente aumentada sobre os hospedeiros. Isso sugere que a presença deste domínio de ligação aumenta a atividade hidrolítica das quitinases sobre substratos insolúveis, assim como, parede celular rica em quitina. Estes resultados sugerem que a quitinase CHI2 de *M. anisopliae* atua sobre um substrato diferente das demais quitinases, assim como, possivelmente ocorre em *Trichoderma* (KIM *et al.*, 2002; LIMÓN *et al.*, 2004).

As quitinases em fungos são pertencentes à família 18 das glicosil-hidrolases, além da classificação quanto ao tipo de sua atividade (exoquitinase ou endoquitinase, esta podendo ser ácida ou básica; SAHAI & MANOCHA, 1993). As quitinases são subdivididas em dois grupos, baseado em sua estrutura primária: as quitinases do tipo bacteriana (*bacterial-like*) e as quitinases do tipo das plantas (*plant-like*) (HENRISSAT, 1999). A partir da análise comparativa e da construção da árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining*, foi observado que as quitinases CHI2 deduzidas do gene *chi2* de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *acridum* pertencem à classe das quitinases de plantas, assim como, seus ortólogos de outros fungos, e a quitinase CHIT30, também de *M. anisopliae*. A quitinase CHIT42 deduzida a partir do gene *chit1*, deste mesmo organismo, pertence à classe das quitinases bacterianas, como já determinado por SILVA e colaboradores (2005).

Deve-se ressaltar que a quitinase CHIT42 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆ possui seu ortólogo em *M. anisopliae* var. *acridum*, de 45 kDa, que aparentemente não está envolvida no processo de infecção, por ser pouco encontrada no sítio de infecção (ST. LEGER *et al.*, 1996b) e por não apresentar alteração na virulência com sua superexpressão no fungo (SCREEN *et al.*, 2001). Além disso, sua regulação é atípica na linhagem E₆ (presente trabalho), sugerindo o seu envolvimento em diferentes etapas da morfogênese do fungo. A exo-endoquitinase CHIT30, por outro lado, apresenta-se como um fator potencial de patogenicidade de *M. anisopliae* (SILVA *et al.*, 2005), podendo atuar de forma sinérgica com a endoquitinase CHI2.

A região de 980 pb a montante da seqüência codificadora do gene *chi2* também foi analisada. Nesta região, foram encontradas as seqüências conservadas *CAAT box* e *TATA box*, localizados a distâncias apropriadas a montante do provável início de transcrição (G⁺), a seqüência ACATCAAG, semelhante à seqüência de consenso do elemento de início de transcrição TCATCANC (EBERLE & RUSSO, 1994), posicionada, 96 pb a montante do códon de início de tradução e que coincide com o primeiro nucleotídeo (G⁺1) transcrito

identificado com a PCR RACE 5'. Foi encontrado apenas um elemento CREA (CCCCAC; CRR1 em *M. anisopliae*, segundo nomenclatura dada por SCREEN e colaboradores, 1997), localizado a 410 pb a montante do provável códon ATG de início de tradução, que é um repressor da expressão gênica em presença de glicose em *A. nidulans* e *M. anisopliae* (CUBERO & SCAZZOCCHIO, 1994; SCREEN *et al.*, 1997).

Entretanto, nenhum elemento GATA, que está envolvido na regulação gênica por presença de fontes de nitrogênio, foi encontrado nesta região, diferentemente do gene *chit1*, previamente caracterizado pelo grupo em *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998), que, além de apresentar dois elementos CREA, possui dois elementos GATA (BOGO, 1999; presente trabalho). Além dessas diferenças a região flanqueadora 5' do gene *chi2* também não apresentou os elementos provavelmente envolvidos na resposta ao estresse, STREs (CCCCT; BRUNNER *et al.*, 2003) e a região rica em pirimidinas, também presentes na região reguladora do gene *chit1* (BOGO, 1999).

Foi realizada uma análise *in silico* da região flanqueadora 5' de genes de quitinases de outros fungos filamentosos que tiveram esta região seqüenciada, com a finalidade de verificar a freqüência destes elementos. Dessa maneira, com a comparação da disposição destes elementos nesta região, foi demonstrado que não existe conservação na presença dos elementos, nem da sua distribuição em relação ao códon de início de tradução, mesmo comparando a região reguladora das quitinases com maior identidade entre si, pertencentes à classe de quitinase do tipo bacteriano, como o gene *chit1* de *M. anisopliae* (BOGO *et al.*, 1998) e seus ortólogos *ech42* de *T. harzianum* (CARSOLIO *et al.*, 1994), *cts1* de *C. Immits* (PISHKO *et al.*, 1996) e *chiB* de *A. fumigatus* (JACKES *et al.*, 2003), ou quitinases da classe das plantas, como o gene *chi2* (presente trabalho) e seu ortólogo *chiA* de *A. nidulans* (TAKAYA *et al.*, 1997). O que pode sugerir um processo de regulação diferente entre as quitinases.

Até o momento os elementos envolvidos na regulação gênica e as funções específicas das diferentes quitinases produzidas por *M. anisopliae* são quase totalmente desconhecidas.

O sistema quitinolítico de *M. anisopliae* é, de modo geral, regulado por um mecanismo de indução/repressão, onde a quitina induz tanto a síntese quanto a secreção de quitinases, enquanto a glicose é um repressor da síntese destas enzimas. Esse mesmo mecanismo de indução-repressão foi encontrado em outros fungos, como *T. harzianum*, *T. atroviride*, *A. fumigatus* e *Streptomyces lividans* (ULHOA & PEBERBY, 1991; DE LA CRUZ *et al.*, 1995; ESCOTT *et al.*, 1998; SAITO *et al.*, 1998; DONZELLI & HARMAN, 2001). A concentração do monômero de NAcGlc também regula a síntese e secreção das

quitinases. Baixas concentrações são indutoras, enquanto altas concentrações têm papel repressor (MORAES, 2002; BARRETO *et al.*, 2004). Sendo que a expressão de quitinases ocorre em cultivos prolongados com picos de atividade específica a partir de 72 h (BOGO *et al.*, 1998). Entretanto, este tipo de abordagem, que nos dá uma visão geral da expressão e secreção das quitinases, torna-se muito superficial quando se deseja determinar a participação de uma quitinase em particular nos processos de morfogênese ou na infecção. Recentemente, trabalhos têm dado ênfase a modelos experimentais que permitem uma visão global do padrão de expressão de *Metarhizium* ssp. frente aos seus hospedeiros, com a utilização de técnicas que incluem o seqüenciamento de ESTs, RDA ou micro-arranjos. Estas metodologias também não são elucidativas o suficiente para revelarem a função de quitinases, servindo apenas como base para pesquisas futuras a partir da identificação de novos genes de quitinases ou inferência de sua regulação (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004; FREIMOSER *et al.*, 2005). Portanto, são necessários estudos mais específicos, como a análise de sua regulação e de sua seqüência reguladora, comprovação de sua presença no sítio de infecção ou apenas na parede celular do fungo e superexpressão ou interrupção gênica. A caracterização do sistema quitinolítico de *M. anisopliae* em nível gênico é essencial para determinar a importância da expressão de cada gene no processo de infecção no hospedeiro.

SILVA e colaboradores (2005), com a finalidade de elucidar a participação da quitinase CHIT30 de *M. anisopliae* na patogenicidade de seu hospedeiro *B. microplus*, realizaram ensaios de imunohistoquímica com um soro anti-CHIT30 e observaram o acúmulo e a difusão da quitinase na cutícula do hospedeiro, após 72 h da inoculação. Os autores também analisaram sua regulação a partir de experimentos de *western*, onde foi possível verificar que a sua secreção é induzida por NAcGlc em baixas concentrações (0,2%), carapaça de carrapato e quitina e, reprimida por glicose 1% e altas concentrações de NAcGlc (1%) em cultivos de 72 h, seguindo o padrão de regulação proposto ao sistema quitinolítico de *M. anisopliae* (MORAES *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2004). BOGO e colaboradores (1998), com o mesmo objetivo, verificaram o padrão de transcrição do gene *chit1*, utilizando a técnica de hibridização de RNA, verificaram que este gene é reprimido em presença de glicose e de NAcGlc 1% e induzido em presença de quitina em cultivos bastante prolongados.

Foi analisado o nível de transcrição dos genes *chit1* e *chi2*, em diferentes fontes de carbono nas condições conhecidas de indução e repressão do sistema quitinolítico (MORAES *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2004), em cultivos iniciais (18 e 30 horas) e em cultivos mais prolongados (48 e 72 horas). Para esta análise foi utilizado a técnica de RT-PCR, pois esta se apresenta como uma alternativa eficiente para análise de transcritos de genes de fungos,

principalmente, para genes pouco expressos (MORISSETTE *et al.*, 2003; STAATS *et al.*, 2004).

O gene *chit1* apresentou uma característica interessante de regulação, que foi a ausência de repressão mesmo em presença de glicose, dado este até o momento não reportado para quitinases de fungos. A exemplo do gene *chi2*, não foi possível detectar transcritos nos cultivos de 18 h. Entretanto, em cultivos de 30 h, houve indução em presença de glicose e NAcGlc, mesmo em baixas concentrações. Este resultado corrobora a hipótese de que a quitinase codificada pelo gene *chit1* está envolvida em processos fisiológicos do fungo (ST. LEGER *et al.*, 1996b; SCREEN *et al.*, 2001), sendo expresso quando há presença de fontes de nutrientes e, por outro lado, sendo pouco induzido quando esta fonte está ausente, como em cultivo de 48 h, com a fonte de carbono (NAcGlc) completamente exaurida, onde era possível observar ausência de crescimento do fungo. Entretanto, a partir de 72 h de cultivo, com o fungo em provável autólise, a quitinase CHIT42 é provavelmente requerida neste processo juntamente com a CHI2 e/ou outras quitinases, como normalmente ocorre em fungos filamentosos (ST. LEGER *et al.*, 1996b; REYES *et al.*, 1989; BARRETO *et al.*, 2004). Em cultivo com glicose, a qual foi sempre suplementada, o gene continuou apresentando transcrição. Em cultivos com quitina a partir de 48 h o gene começou a apresentar transcrição, que aumentou no cultivo de 72 h. Neste mesmo período, o gene também foi transcrito em cultivo com cutícula de carrapato como fonte de carbono.

A diferença no tempo de início de transcrição entre o cultivo em quitina e cutícula de carrapato, como fonte de carbono, pode ser devido a quitina comercial, apesar de ainda ser bruta, ser mais pura, sem outros constituintes do exoesqueleto de artrópodes, como lipídeos ou proteínas, sendo assim, menos resistente ao ataque do fungo, com liberação de seu principal componente, o NAcGlc, que serve como fonte de nutrição. Enquanto, a cutícula não tratada, apresenta mais resistência ao ataque e em consequência uma dificuldade maior ao acesso do fungo à quitina, retardando o estímulo para a produção das quitinases. O menor crescimento em cutícula é notado pela menor massa micelial obtida nesta condição do que no meio com quitina (dado não mostrado). Estes resultados corroboram os obtidos por SILVA e colaboradores (2005) que estudaram o acúmulo da quitinase de 30 kDa de *M. anisopliae* na cutícula de *B. microplus* e por ST. LEGER e colaboradores (1996b), que estudaram o acúmulo da quitinase de 45 kDa de *M. anisopliae* na cutícula de *Manduca sexta*, em ambos os estudos, foi observado a produção, da respectiva quitinase, pelas estruturas de infecção na superfície da cutícula, em níveis baixos durante o processo inicial de penetração, e maiores

níveis de acúmulo, tardiamente, nos sítios de degradação proteolítica, sugerindo que a produção de quitinases é dependente da acessibilidade do substrato.

Apesar desses resultados não serem definitivos, eles sugerem, juntamente com outros resultados obtidos até o momento (ST. LEGUER *et al.*, 1996b; SCREEN *et al.*, 2001), que a quitinase CHIT42, codificada pelo gene *chit1*, pode estar envolvida no crescimento das hifas, segundo a teoria de BARTINICKI-GARCIA (1968; 1973). Entretanto, é necessário que novas metodologias de estudo sejam utilizadas visando ao esclarecimento desta questão (discutida adiante). Seria, ainda, necessária uma análise da função de diferentes fontes de nitrogênio na regulação, visto que, para outras quitinases de fungos, está intrinsecamente relacionada a sua regulação de transcrição (DONZELLI & HARMANN, 2001).

O gene *chi2* não teve seus transcritos detectados em estágios iniciais, como nos cultivos de 18 e 30 h, corroborando os vários resultados anteriores que indicam que as quitinases são expressas em estágios tardios de cultivos (BOGO *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2004) ou, ainda, que, pela presença muito baixa desses transcritos juntamente com a limitação de sensibilidade da técnica, estes não foram detectados. Por outro lado, o cultivo com quitina foi a primeira condição a induzir sua transcrição em cultivo de 48 h e continuou posteriormente em escalas maiores, ao passo que o cultivo com glicose como fonte de carbono inibiu continuamente a sua transcrição, como era de se esperar. No cultivo de 48 h, em concentração baixa de NAcGlc, quando esta fonte de carbono certamente não estava mais presente, o gene começou ser transcrito, mesmo que em níveis baixos, sendo estes mais abundantes no estágio posterior, ou seja, em 72 h, a exemplo do gene *chit1*. Isto permite-nos inferir que não é a NAcGlc em baixas condições que induz a transcrição, e sim a sua escassez, o que provavelmente leva o organismo a entrar em autólise, requerendo uma quantidade maior de quitinases para degradação da parede celular do fungo e, ainda, a indução ser ocasionado por estresse, como ocorre com quitinases de *T. harzianum* e *A. fumigatus* (ULHOA & PEDEERBY, 1991; MACH *et al.*, 1999; JAQUES *et al.*, 2003). Vários trabalhos em *M. anisopliae* destacavam a indução de quitinases por NAcGlc, em concentrações baixas, por um possível efeito de indução pelo produto de degradação da quitina. Aparentemente, isto não ocorre com todos os genes de quitinases, o que implicaria em um mecanismo de regulação diferente para algumas quitinases de *M. anisopliae*, a exemplo do que ocorre com os genes *chit1* em relação aos genes *chi2* e *chi3* (ST. LEGER *et al.*, 1986b; MORAES *et al.*, 2002; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Um ortólogo da quitinase CHI2 foi isolado e caracterizado em *A. nidulans*, a quitinase de 69 kDa CHIA, codificada pelo gene *chiA* (TAKAYA *et al.*, 1997). A inativação do gene

não causou alterações morfológicas nos conidióforos ou nas hifas, entretanto, a germinação dos conídios e o crescimento das hifas diminuíram substancialmente. O gene apresentou maior indução durante o crescimento das hifas, tendo a sua expressão aumentada de duas vezes durante o desenvolvimento dos conidióforos, indicando que a quitinase CHIA de *A. nidulans* é regulada temporalmente na morfogênese (TAKAYA *et al.*, 1997). Outro ortólogo de CHI2, a quitinase CTS1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, atua na morfogênese do septo primário, que é o único local onde está restringida a presença de microfibrilas de quitina (CABIB, 1989). Foi observado que a inativação do gene *cts1*, levou a deficiência na separação entre as células-mãe e células-filhas (KURANDA & ROBBINS 1991). Estes resultados levam a sugerir que estes ortólogos de CHI2 apresentam a participação e a função no crescimento do fungo. Entretanto, estes organismos não são entomopatogênicos e, portanto, estas enzimas obrigatoriamente não estariam envolvidas na patogenicidade.

Por outro lado, a predita quitinase CHI2, que além de apresentar estrutura e regulação diferente da quitinase CHIT42, não envolvida na patogenezidade, apresentou regulação e classificação semelhante da CHIT30, que é candidata a fator de virulência. Além disso, com a possível habilidade de degradar substratos brutos, pela presença do domínio de ligação à celulose, poderíamos inferir outras duas possíveis funções à quitinase CHI2. A primeira é o seu envolvimento na nutrição com a degradação de substratos brutos e, ao mesmo tempo na patogenicidade, pois facilitaria o acesso do fungo no hospedeiro pela permeabilização dessa barreira, juntamente com outras hidrolases, incluindo quitinases, e o processo mecânico, (o que é corroborado com sua indução tardia). A segunda é a sua possível função na competição com outros fungos filamentosos pelo ambiente (ou hospedeiro), servindo como ferramenta de defesa e proteção, atuando dessa maneira juntamente com glicanases como ocorre em *Trichoderma* (ULHOA & PEDEERBY, 1991; NORONHA & ULHOA, 1996; NORONHA & ULHOA, 2000; KIM *et al.*, 2002; LIMÓN *et al.*, 2004).

Além das inúmeras atividades compreendendo o sistema quitinolítico (ST. LEGER *et al.*, 1993; PINTO *et al.*, 1997), a complexidade da sua regulação pode ser ainda aumentada, visto que pode estar condicionada à regulação de outras enzimas, envolvidas juntamente com as quitinases em processos fisiológicos, como: as quitina-sintases, envolvidas no alongamento e crescimento das hifas (GOODAY *et al.*, 1992; FREIMOSER *et al.*, 2003; RASTA *et al.*, 2003); proteases e lipases, possivelmente relacionadas com a infecção (ST. LEGUER *et al.*, 1986a; b; FREIMOSER *et al.*, 2003; BEYS SILVA *et al.*, 2004); quitina desacetilases, quitosanases e as glicosidases, também com potencial envolvimento na infecção ou nutrição pela degradação da parede celular do hospedeiro e no crescimento celular do fungo

(FREIMOSER *et al.*, 2003; ADAMS *et al.*, 2004; NAHAR *et al.*, 2004). Dessa maneira, a complexidade da regulação e da função das quitinases em *M. anisopliae*, torna-se maior do que se poderia imaginar, estando longe de ser completamente resolvida.

Uma alternativa eficiente para análise da participação de enzimas em processos como a infecção ou mesmo na morfogênese do fungo é a partir de sua inativação ou de sua superexpressão no próprio organismo, com a inserção de uma ou mais cópias do gene que a codifica sob a regulação de um promotor forte (ST. LEGER *et al.*, 1996b; JONG-MIN *et al.*, 1999; SCREEN *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2005) e ainda a análise da região reguladora (TAKAYA *et al.*, 1997; VITERBO *et al.*, 2001). É importante, portanto, o desenvolvimento de metodologias confiáveis para obtenção de transformantes, com um processo de transformação, incluindo a marca de seleção, bem definidos. Nosso grupo vem desenvolvendo este tipo de trabalho utilizando algumas metodologias bastante difundidas, como a biobalística e o uso de benomil como marca de seleção (BOGO *et al.*, 1996) e, recentemente, tem dado ênfase a novas metodologias de transformação com o uso de *Agrobacterium tumefaciens* (C. Staats, comunicação pessoal) e novas marcas de resistência, como o glifosinato de amônio (C. Staats & L. Nakazato, comunicação pessoal).

Para elucidação da função da endoquitinase CHIT42, codificada pelo gene *chit1*, em *M. anisopliae*, foram efetuadas transformações para superexpressão do gene *chit1*, assim como, para análise da sua região reguladora, utilizando a marca de seleção que confere resistência ao fungicida Benomil (gene β -tubulina *ben*^R isolado de *N. crassa*; ORBACH *et al.*, 1986). Estes experimentos, apresentaram resultados insatisfatórios, não apenas pelos transformantes apresentarem alterações morfológicas das colônias e diminuição na produção de esporos, como descrito por BOGO e colaboradores (1996), mas também pela baixa eficiência e pela maioria dos transformantes serem abortivos e falso positivos, a exemplo de outros experimentos efetuados no laboratório (C. Staats & L. Nakazato, comunicação pessoal).

A utilização de uma nova marca de seleção, como o glifosinato de amônio (THOMPSON *et al.*, 1987), apresentou bons resultados, pois mesmo com a baixa eficiência de transformação, mais de 50 % dos transformantes foram estáveis, o que foi demonstrado tanto pelos experimentos de PCR como de hibridização de DNA genômico. Apenas com exceção, para a transformação com uma das construções contendo *sgfp* e o promotor do gene *chit1* com deleção (pF3GFPBAR), para tal qual, será necessária a checagem do restante dos possíveis transformantes ou, ainda, novos experimentos de transformação, pois dentre os dois analisados, nenhum transformante confirmou a presença da construção.

Nos possíveis transformantes obtidos para a superexpressão do gene *chit1*, após a comprovação da transformação com a análise por hibridização, foram efetuados ensaios de detecção de quitinases que demonstraram secreção de endoquitinase no sobrenadante significativamente maior que nos controles. Entretanto, estes resultados não são definitivos, sendo necessária a confirmação de que a quitinase com maior expressão é a CHIT42, com experimentos de *Western* ou de gel de atividade (ST LEGER *et al.*, 1993). Os resultados indicam que o transformante Tchit1.1, com duas cópias inseridas do gene *chit1*, apresentou uma atividade específica de quitinase maior que o transformante Tchit1.2 com quatro cópias, o que pode ser devido ao local de inserção das construções e/ou a inserção apenas de parte da construção no genoma, propiciando uma expressão menor da quitinase, mesmo que, com maior número de cópias.

SCREEN *et al.* (2001), em experimento bastante similar, obtiveram transformantes superexpressando a quitinase CHIT42, que não aumentaram a virulência sobre a lagarta de *M. sexta*. Entretanto, nesse experimento, os autores introduziram o gene *chil* (ortólogo do gene *chit1* em *M. anisopliae* E₆), que codifica para uma quitinase ácida e foi isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* (uma linhagem virulenta específica para a lagarta *M. sexta* e altamente secretora de quitinases), em *M. anisopliae* var. *anisopliae* (uma linhagem pouco produtora de quitinases e com ampla gama de hospedeiros; FREIMOSER *et al.*, 2003).

Apesar das evidências da participação da quitinase CHIT42 em processos de morfogênese, estas ainda devem ser esclarecidas, pois a confirmação do seu não envolvimento na patogenicidade permaneceu obscura, a partir da metodologia de superexpressão do gene *chil* em um organismo patogênico não específico (SCREEN *et al.*, 2001), comparado com a protease PR1A, cuja sua superexpressão em uma linhagem virulenta específica, aumentou a infectividade (ST. LEGER *et al.*, 1996a). Como vários trabalhos indicam, a capacidade de virulência de um fungo entomopatogênico, a um determinado hospedeiro, deve-se a uma série de fatores, entre os quais, destaca-se a ação de enzimas hidrolíticas que estão entre os principais fatores de virulência, atuando de maneira sinérgica (ST. LEGER *et al.*, 1986a; b; 1987; 1988; 1996a;b FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004). Dessa maneira, não se poderia esperar que, apenas a superexpressão de um desses possíveis fatores, fosse o suficiente para conferir a virulência em um organismo que não tenha outros fatores básicos para tal, como ocorrera em outros experimentos, nos quais a enzima foi superexpressa na mesma linhagem em que se objetivava testar a sua participação (ST. LEGER *et al.*, 1996a; GICZEY *et al.*, 1998; CARSSOLLO *et al.*, 1999; LIMON *et al.*, 1999; FANG *et al.*, 2005).

Durante a obtenção das construções para superexpressão do gene *chit1*, foram também obtidas construções com o gene no sentido antisenso, e este também foi transformado em *M. anisopliae*, sendo um transformante confirmado. Apesar do resultado dos ensaios enzimáticos ter apresentado uma diminuição significativa em relação aos controles, esta diferença foi pequena. É necessária, portanto, a obtenção de novos transformantes e uma melhor caracterização destes, para comprovar a funcionalidade da técnica de RNA antisenso e sua utilização para ensaios de inibição da tradução.

Esta técnica vem sendo utilizada em experimentos com algum sucesso, com diminuição da expressão em mais 50%, a partir da obtenção de células eucariotas transfectadas e com expressão de RNA antisenso para um determinado gene (SU *et al.*, 1998). A técnica está baseada no fenômeno observado em procariotos e em células de eucariotos, como humanos e ratos, onde observava-se regulação pela presença de RNA nativo (antisenso), servindo como um mecanismo de regulação em diferentes processos fisiológicos (SIMONS, 1988). Esta técnica pode ter grande relevância em organismos como fungos filamentosos, e com provável sucesso, principalmente, nos casos onde são encontrados RNAs com possível função de regulação na transcrição (DE LA PAZ GIMÉNEZ-PECCI *et al.*, 2002). Isto também ocorre em linhagens de *M. anisopliae* que possuem micovírus com RNA fita dupla, nos quais o padrão morfológico é alterado, e há expressão diferenciada de proteínas, como as quitinases, em relação aos não infectados com micovírus (BOGO *et al.*, 1996; FRAZZON *et al.*, 2000; DE LA PAZ GIMÉNEZ-PECCI *et al.*, 2002). Sendo uma técnica alternativa quando há dificuldade na obtenção de genes silenciados por técnicas de disrupção gênica.

Entretanto, além da comprovação final da funcionalidade da técnica de RNA antisenso, com a diminuição da expressão da quitinase CHIT42, é necessária a análise deste transformante e dos transformantes superexpressando esta quitinase para verificar possíveis alterações morfológicas, de crescimento e esporulação. E, por fim, a realização de bioensaios não apenas com insetos (SCREEN *et al.* 2001), mas também com carrapatos no qual a linhagem E₆ é a mais virulenta (FRAZZON *et al.*, 2000).

O mapeamento de elementos envolvidos na ativação da transcrição em resposta à presença de quitina e a efetiva participação de cada um destes elementos identificados na regulação da expressão do gene *chit1* podem ser experimentalmente demonstrados. Assim, a estratégia proposta envolveu a fusão da região flanqueadora 5' completa e de deleções desta região com diferentes combinações desses prováveis elementos e a ORF do gene *sgfp* (FERNANDEZ-ÁBALOS *et al.*, 1998). Os transformantes de *M. anisopliae* obtidos que continham as construções foram testados em cultivos com diferentes fontes de nutrientes,

como as condições de indução ou repressão de expressão da quitinase CHIT42, de acordo com os resultados de RT-PCR: cultivos com quitina, glicose ou NAcGlc em altas ou baixas concentrações. Entretanto, não foi possível detectar a presença de fluorescência a partir de análise por microscopia de fluorescência, ao passo que, ao utilizarmos a construção controle contendo o promotor de *tefla*, a fluorescência foi facilmente visualizada. De qualquer forma, além de uma nova avaliação dos restantes dos transformantes não-analisados, são necessárias novas análises utilizando outras ferramentas, como uso de fluorímetro (FERNADEZ-ÁBALOS *et al.*, 1998), que poderão auxiliar na detecção da GFP, visto que esta pode estar sendo expressa pelos transformantes em quantidades não detectáveis por microscopia de fluorescência. E ainda, pode ser necessária uma análise por RT-PCR, para verificarmos se há transcrição do gene *sgfp* nesses transformantes.

Estes experimentos nos permitirão obter informações sobre o envolvimento destes elementos no processo de regulação da CHIT42 que, juntamente com a superexpressão ou a sua inativação, que corroboram a elucidação do envolvimento dessa quitinase mesmo em processos fisiológicos ou ainda, de infecção.

6 – CONCLUSÕES

O gene *chi2* foi isolado de *M. anisopliae* var. *anisopliae* linhagem E₆, estando presente em cópia única. O gene *chi2* codifica para uma proteína madura predita de 42 kDa, denominada CHI2. Possui uma ORF de 1.542 pb e apresenta dois íntrons. A proteína predita, além de apresentar as seqüências de consenso de quitinases da família 18 das glicosil-hidrolases, SXGG e NGDFDIE (com uma alteração em relação ao, consenso de D→N), apresenta um domínio de ligação a celulose (CBD).

O gene *chi2* é regulado por um mecanismo de indução-repressão, sendo reprimido por glicose e induzido tardiamente por quitina e cutícula. É um possível candidato a participar no processo de infecção, entretanto, apresenta ativação na autólise. O gene *chit1* apresentou indução em presença de fontes carbono, como glicose e NacGlc, e na fase de autólise, sendo um candidato a participar em etapas de morfogênese do fungo.

A região flanqueadora 5' do gene *chit1* e deleções desta foram utilizadas em construções de repórteres para análise de funcionalidade de promotor, controlando o gene *sgfp* e três destas construções e os respectivos controles foram transformados em *M. anisopliae* E₆.

Foi procedida a clonagem do gene *chit1* nas orientações direta (senso) e reversa (antisense) em um vetor de expressão para *M. anisopliae*. Estas construções foram transformadas para a linhagem E₆. Dois transformantes (orientação senso) apresentaram um aumento significativo na expressão de endoquitinase e um (orientação antisense) apresentou uma pequena diminuição nesta atividade em relação ao selvagem.

7 - PERSPECTIVAS

Amplificar e clonar o cDNA do gene *chi2* de *M. anisopliae* E₆ em vetores para a expressão em *Escherichia coli* para purificação e caracterização da quitinase CHI2, efetuar mutações dirigidas para análise das alterações na atividade da enzima pela substituição de aminoácidos do domínio catalítico da enzima em relação ao consenso, e estudar o efeito da presença do domínio de ligação a celulose (CBD). O gene ainda deverá ser clonado em vetor de expressão e transformado para *M. anisopliae*, para verificar a participação da quitinase CHI2 na infecção do carrapato *Boophilus microplus*.

Verificar a função do gene *chit1* em *M. anisopliae* analisando os transformantes com as construções contendo o gene *chit1* sob regulação do promotor do gene *tefl α* , que apresentem diferenças na secreção da endoquitinase. Tais transformantes deverão ser testados em bioensaios, com insetos e o carrapato *Boophilus microplus* como hospedeiros e para analisar efeitos no desenvolvimento do fungo a partir de alterações morfológicas.

Mapear a região flanqueadora 5' do gene *chit1* a partir dos transformantes obtidos, para detectar elementos reguladores utilizando técnicas mais sensíveis para a detecção de GFP, como o uso de fluorímetro (FERNANDEZ-ÁBALOS *et al.*, 1998), ou ainda, uma análise por RT-PCR, para verificar se há transcrição do gene *sgfp* nesses transformantes. A partir dessas análises quantitativas e semi-quantitativas, poder-se-á definir quais dos prováveis elementos presentes na região flanqueadora 5' do gene *chit1* estão envolvidos na regulação da expressão do gene.

8 - Referências Bibliográficas

- AALTEN, D. M. F.; SYNSTAD, B.; BRURBERG, M. B.; HOUGH, E.; RIISE, B. W. ; EIJSINK, G.H. & WIERENGA, R. K. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1,9 Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 97(11): 5842-5847, 2000.
- ADAMS, D. J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, 150 : 2029–2035.
- ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. In CROCOMO, W. B. **Manejo integrado de pragas**, p147-176. São Paulo: Editora UNESP, 1990.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz, 1998, 340p.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Resear.**, 25 : 3389–3402.
- AMIRI, B. (2000) Inter and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp. and its significance to pathogenesis. **Mycol. Res.**, 104(4): 447-52,.
- AN, Z., MEI, B., YUAN, W.M. & LEONG, S.A. (1997) The distal GATA sequences of the *sid1* promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor. **EMBO J.**, 16(7): 1742-1750.
- ANDERSEN, S. O. (1974) Biochemistry of insect cuticle. **Ann. Rev. Entomol.**, 24: 29-61.
- ANSARI, M.A.; VESTERGAARD, S.; TIRRY, L. & MOENSA, M. (2004) Selection of a highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. **J. Invertebr. Pathol.**, 85 : 89–96.
- ARRUDA, V. (2005) **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- AVALOS, J.;GREEVER, R. F. & CASE, M. E. (1989) Bialaphos resistance as a domain selectable marker in *Neurospora crassa*. **Curr. Genet.**, 16 : 369-372.
- BABIKER, M.; ABDEL-BANAT, A. & KOGA, D. (2001) A genomic clone for a chitinase gene from the silkworm, *Bombyx mori*: structural organization identifies functional motifs. **Insect Biochem Mol Biol.**, 31 : 497–508.
- BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S. E. & ST. LEGER, R. J. (2003) Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, 324 : 159–169.

- BALANCE, D. J. (1986) Sequences important for gene expression in filamentous fungi. **Yeast**, 2 : 229–236.
- BALLARIO, P., VITTORIOSO, P., MAGRELLI, A., TALORA, C., CABIBBO, C. & MACINO, G. (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora crassa* is a zinc finger protein. **EMBO J.**, 15 : 1650-1657.
- BARATTO, C. M. (2001) **Detecção e expressão de quitinases do entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae***. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BARATTO, C. M.; SILVA, M. V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. (2003) Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.**, 49(11) : 723-728.
- BARRETO, C. C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-acetylglucosamine in protein secretion. **Curr. Microbiol.**, 48 : 102-107.
- BARTINICK-GARCIA, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Ann. Rev. Microbiol.**, 22 : 87-108.
- BARTINICK-GARCIA, S. (1973) Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. In: Microbial Differentiation (Ashworth, J. M. & Smith, J. E., Eds.), pp. 245-267. **Cambridge University Press**, London.
- BÉGUIN, P. & AUBERT, J.-P. (1994) The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.**, 13 : 25-58.
- BEYS SILVA, W. O.; MITIDIERI, M.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2004) Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Proc. Biochem.**, 40 : 321–326.
- BIDOCHKA, M. J.; ST LEGER & ROBERTS, D. W. (1997) Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomol. Soc. Can.**, 171 : 213-224.
- BIDOCHKA, M. J. & MELZER, M. J. (2000) Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B and Pr1C) from *Metarhizium* strains. **Can. J. Microbiol.**, 46(12) : 1138-1144.
- BIELKA, H., DIXON, H. B. F., KARLSON, P., LIEBEEQ, C., SHARON, N., VAN LENTEN, B. J., VECLICK, S. F., VLIAGENTHART, J. F. G., & WEBB, E. C. (1984) **Enzyme Nomenclature**, Academic Press, New York.
- BITTENCOURT, S. E. T.; CASTRO, L. A.; FARIAS, S. E.; BAO, S. N.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2004) Purification and ultrastructural localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. **Res. Microbiol.**, 155 : 681–687.

- BITTENCURT, V. R. E. P.; MASCARANHAS, A. G.; FACCINI J. L. H. (1999) Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, 29 : 351-353.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. (2000) Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 916 : 555-558.
- BLACKWELL, J. (1988) Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. **Methods Enzymol.**, 161 : 435-442.
- BOGO, M. R. (1999) **Genes que codificam quitinases no entomopatógeno *Metarhizium anisopliae***. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; SILVA, D. M.; GIMÉNEZ, M. P.; AZEVEDO, J. L. & SCHRANK, A. (1996) Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycol. Res.**, 100(12): 1468-1472.
- BOGO, M. R., VAINSTEIN, M. H., ARAGÃO, F. J., REACH, E., SCHRANK, A. (1996) High frequency gene conversion among benomil resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 142 : 123-127.
- BOGO, M. R., ROTA, C. A, PINTO JR, H., OCAMPOS, M., CORRÊA, C. T., VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. **Curr. Microbiol.**, 37 : 221-225.
- BRADFORD, M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.**, 72 : 248-254.
- BRUNNER, K.; MONTERO, M.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K. & KUBICEK, C. P. (2003) Expression of the *ech42* (endochitinase) gene of *Trichoderma atroviride* under carbon starvation is antagonized via a BrlA-like cis-acting element. **FEMS Microbiol. Lett.**, 218 : 259-264.
- CABIB, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. **Adv. Enzymol.**, 59 :101.
- CARSOLIO, C.; GUTIERRES, A.; JIMÉNEZ, B.; VAN MONTANGU, M. & HERRERA-ESTRELA, A. (1994) Characterization of *ech-42*, *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, 91 : 10903-10907.
- CARSSOLO, C.; BENHAMOU, N.; HARAN, S.; CORTES, C.; GUTIERRES, A.; CHET, I. & HERRERA-ESTRELLA, A. (1999) Role of the *Trichoderma arzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism, **Appl. Environ. Microbiol.**, 65 : 929-935.
- CARLSON, M. (1999) Glucose repression in yeast. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2 : 202-207.

- CLARKSON, J. M. & CHARNLEY, A. K. (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trend Microbiol.**, 4(5): 197-203.
- CORREIA, A. C. B., FIORIN, A. C., MONTEIRO, A. C. & VERÍSSIMO, C. J. (1998) Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in *Sabled cattle*. **J. Invertebr. Pathol.**, 71 : 189-191.
- CUBERO, B., & SCAZZOCCHIO, C. (1994) Two different adjacent and divergent zing-finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspegillus nidulans*. **EMBO J.**, 13 : 407-415.
- DAWZER, C. R. A. & KELLY, J. M. (1991) Analysis of the the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Cell. Biol.**, 11 : 5701-5709.
- DE LA PAZ GIMÉNEZ-PECCI, M. P.; BOGO, M. R.; SANTI, L.; KRIEGER DE MORAES, C. K.; CORRÊA, C. T.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. (2002) Characterization of mycovirus and analyses of chitinases secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Curr. Microbiol.**, 45: 334-339.
- DIMBI, S.; MANIANIA1, N. K.; LUX, S.; EKESI, S & MUEKE, J. K. (2003) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitits capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera :Tephritidae) **Mycopathology**, 156: 375–382.
- DONZELLI, B. G. G. & HARMAN, G. E. (2001) Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67(12): 5643-5647.
- DOWER, W.J. 1988. Transformation of *E. coli* to extremely high efficiency by electroporation. **Mol. Biol. Repts.**, 6 : 3-4.
- DRIVER, F., MILNER, R. J. & TRUEMAN, J. W. H. (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol. Res.**, 104 : 134-150.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; IRENE SILVEIRA SCHRANK, VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Res. Microbiol.**, 155 (2004) 245–251.
- EBERLE, J & RUSSO, V. E. (1994) *Neurospora crassa* blue light-inducible gene *bli-3*. **Biochem. Mol. Biol.**, 34(4) : 737-744.
- ESCOTT, G.; HEARN, V. M.; ADAMS, D. J. Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, 144: 1575-1581, 1998.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y. & PEI, P. (2005) Cloning of *beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71 : 363-370.

- FERNANDEZ, F. B. (2000) The employment of biological and non-chemical alternatives for insect plague control in sugarcane crops in Costa Rica. **International Sugar J.**, 102 : 482-490.
- FERNÁNDEZ-ÁBALOS, J. M.; FOX, H.; PITT, C.; WELLS, B. & DOONAN, J. H. (1998) Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol.**, 27 : 121.
- FLACH, J., PILET, P. E. & JOLLES, P. (1992) What's new in chitinase research? **Experientia**, 48 : 90-96.
- FONTES, E. G. (1992) Fungo é o inimigo natural. In: ALVARENGA, O. M. **Manual de controle biológico**. p. 27-28. Sociedade Nacional de Agricultura, Rio de Janeiro.
- FRANCETIC, O., BADAUT, C., RIMSKY, S. & PUGSLEY, A. P. (2000). The ChiA (*YheB*) protein of *Escherichia coli* k-12 is an endochitinase whose gene is negatively controlled by the nucleoid-structuring protein H-NS. **Mol. Microbiol.** 35(6): 1506-1517.
- FRAZZON, A. P. G.; VAZ JUNIOR, I. S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterin. Parasitol.**, 94 : 117–125.
- FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G. & ST LEGER, R. J. (2003) Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, 149 : 239–247.
- FREIMOSER, F. M.; HU, G. & ST LEGER, R. J. (2005) 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.
- FU, Y. H., FENG, B. EVANS, S., MARZLUF, G. A. (1995) Sequence-specific DNA binding by NIT4, the pathway-specific regulatory protein that mediates nitrate induction in *Neurospora*. **Mol. Microbiol.**, 15 : 935-942.
- GABRIEL, B.P. (1968). Enzymatic activities of some entomopathogenic fungi. **J. Invertebr. Pathol.**, 11:70-81.
- GICZEY, G.; KERÉNYI, Z.; DALLMANN, G. & HORNOK, L. (1998) Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase encoding gene, resulting in increased levels of chitinase activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, 165 : 247-252.
- GILCHRIST, D. G. (1998) Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. **Ann. Rev. Phytopathol**, 36 : 393–414.
- GILLESPIE, J. P.; BATERMAN, R. & CHANRLEY, K. (1998) Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium anisopliae* spp. For the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **J. Invertebr. Pathol.**, 71 : 128-137.

- GOETTEL, M. S.; ST. LEGER, R. J.; BHAIRI, S.; JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R. & ROBERTS, D. W. (1990) Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stable transformed to benomil resistance. **Curr. Genet.**, 17 : 129-132.
- GOLDSTEIN, M. A.; TAKAGI, M.; HASHIDA, S.; SHOSEYOV, O.; DOI, R. H. & SEGEL, I. H. (1993) Characterization of the cellulose-binding domain of the *Clostridium cellulovorans* cellulose-binding protein A. **J. Bacteriol.**, 175 : 5762-5768.
- GONZALES, R., GAVRIAS, V., GOMES, D., SCAZZOCCHIO, C. AND CUBERO, B. (1997) The integration of nitrogen and carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* requires the GATA factor AreA and an additional positive-acting element, ADA. **EMBO J.** 16(10) : 2937-2944.
- GOODAY, G. (1990) The ecology of chitin degradation. **Microbiol. Ecol.**, 10 : 387-431.
- GOODAY, G. H., ZHU, W. Y. & DONNELL, R. W. (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? **FEMS Microbiol. Lett.**, 100 : 387-392.
- HANAHAN, P. F. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Mol. Biol.**, 166 : 557-580.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, R. M.; DIPIETRO, A.; PETERBAUER, C. & TRONSMO, A. (1992) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Mol. Plan. Pathol.** 83: 313-318.
- HENRISSAT, B. (1999) Classification of chitinases modules, in: P. Jollès, R. A. A. Muzzareli (Eds.), Chitin and chitinases, Basel, Switzerland, 39 Burkhäuser : 137–156.
- HO, M.-C., WHITEHEAD, M. P., CLEVELAND, T. E. & DEAN, R. A. (1995) Sequence analysis of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase *pelA* gene and evidence for binding of promoter regions to CREA, a regulator of carbon catabolite repression. **Curr. Genet.** 27: 142-149.
- HSIAO, Y. M. & KO, J. L. (2001) 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.
- HUXHAM, I. M.; SAMUELS, K. D. L.; HEALE, J. B.; McCORKINDALE, N. J. *In vivo* and *in vitro* assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. **J. Invertebr. Pathol.**, 53: 143-151, 1989.
- JAQUES, A. K.; FUKAMIZO, T.; HALL, D.; BARTON, R. C.; ESCOTT, G. M.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C. A. & ADAMS, D. J. (2003) Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. **Microbiology**, 149 : 2931–2939.
- JONG-MIN, B.; HOWELL, C. R. & KENERLEY, C. M. (1999) The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Curr. Genet.**, 35 : 41-50.

- JOSHI, L., ST. LEGER, R. J. & ROBERTS, D. W. (1997) 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.
- KANG, S. C., PARK, S. & LEE, D. G. (1998) Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 165(2) : 272-271.
- KANG, S. C., PARK, S. & LEE, D. G. (1999) Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, 73 : 276-281.
- KANGA, L. H.; JONES, W. A. & JAMES, R. R. (2003) Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. **J. Econ. Entomol.**, 96(4) : 1091-9.
- KASSA, A.; STEPHAN, D.; VIDAL, S. & ZIMMERMANN, G. (2004) Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged conidia for locust and grasshopper control. **Mycol. Res.** 108 (1) : 93–100.
- 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 3 species of insect. **J. Invertebr. Pathol.**, 74: 213-223, 1999.
- KEYHANI, N. O. & ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochem. Biophys. Acta**, 1473: 108-122, 1999.
- KIM, D. J.; BAEK, J. M.; URIBE, P.; KENERLEY, C. M. & COOK, D. R. (2002) Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. **Curr. Genet.**, 40(6) : 374-84.
- KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S. & KEYHANI, N. O. (2004) Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Ixodidae* tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **J. Med. Entomol.**, 41(4) : 705-11.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B. & NEI, M. (2001) MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics** 17 : 1244– 1245.
- KUPFER, D. M.; DRABENSTOT, S. D.; BUCHANAN, K.L.; LAI, H.; ZHU, H.; DYER, D. W.; ROE, B. A & MURPHY, J.W. (2004) Introns and splicing elements of five diverse fungi. **Eukaryotic Cell**, 1088-1100.
- KURANDA, M. J. & ROBBINS, P. W. (1991) Chitinase is required for cell separation during the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, 266 : 19758-19767.
- LAVERLAM S.A. Cali – Colombia. Fevereiro, 1999.
http://cali.cetcol.net.co/~laverlam/e_index.html.

- LIMÓN, M. C.; CHACÓN, M. R.; MEJÍAS, R.; DELGADO-JARANA, J.; RINCÓN, A. M.; CÓDON, A. C & BENÍTEZ, T. (2004) Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 64 : 675–685.
- LIMON, M. C.; PINTOUR, J. A. & BENITEZ. (1999) Increased anti-fungal activity of *Trichoderma harzianum* transformantes that overexpress a 33-kDa chitinase. **Phytopathologia** 89 : 254-261.
- LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J. & LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its Anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **J. Invertebr. Pathol.**, 78: 178-182, 2001.
- LORITO, M.; MACH, R. L.; SPOSATO, P.; STRAUSS, J.; PETERBAUER, C. K. & KUBICEK, C. P. (1996) Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93 : 14868-14872.
- MACH, R. L.; PETERBAUER, PAYER, K.; JAKSITS, S.; WOO, S. L.; ZEILINGER, S.; KULLNIG, C. M.; LORITO, M. & KUBICEK1 C. P. (1999) Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65(5) : 1858–1863.
- MARQUES, E. J., VILLAS-BOAS, A. M.; PEREIRA, C. E. F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em laboratórios setoriais. Piracicaba, PLANALSUCAR, Boletim técnico 3, p.5-23, 1981.
- MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúma, SP: EMBRAPA, 1998, v.1, 264p.
- MERZENDORFER, H & ZIMOCH, L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J Exp Biol.**, 206(24) : 4393-412.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (2002) Relatório ambiental / Embrapa - empresa brasileira de pesquisa agropecuária, Brasília-DF, **Balanco ambiental / embrapa**, 21ed, 67p.
- MORAES, C. K.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. (2002) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Curr. Microbiol.**, 46 : 205–210.
- MOREIRA, C. A. (1998) **Regulação da secreção de proteínas do entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, D.F.
- MORISSETTE, D. C.; DRISCOLL, T. & JABAJI-HARE, S. (2003) Molecular cloning, characterization, and expression of cDNA encoding an endochitinase gene from the mycoparasite *Stachybotrys elegans*. **Fungal Genet. Biol.**, 39 : 276-285.

- MURO-PASTOR, M. I., GONZALES, R., STRAUSS, J., NARENDJA, F. & SCAZZOCCHIO, C. (1999) The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eucaryotic bidirectional promoter. **EMBO J.**, 18 : 1584-1597.
- NAHAR, P.; GHORMADE, V. & DESHPANDE, M. V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests **J. Invertebr. Pathol.** 85 : 80–88
- NEHLIN, J. O. CARLBERG, M. & RONNEL, H. (1991) Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. **EMBO J.**, 10 : 3373-3377.
- NICHOLAS, K. B & NICHOLAS, H. B Jr. (1997) Genedoc: a tool for editing and annotation multiple sequence alignments. Distributed by authors (www.psc.edu/biomed/genedoc).
- NORONHA E. F. & ULHOA, C. J. (1996) Purification and characterization of an endo- β 1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol.**, 42 : 1039-1044.
- NORONHA E. F. & ULHOA, C. J. (2000) Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma arzianum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 183 : 119-123.
- NOWIERSKI, R. M.; ZENG, Z.; JARONSKI, S.; DELGADO, F. & SWEARINGEN, W. (1996) Analysis and modeling of time–dose–mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Paecilomyces* isolates from Madagascar. **J. Invertebr. Pathol.**, 67 : 236–252.
- OMICHIANSKI, J. G., CLORE, M., SCHAAD, O., FELSENFELD, G., TRAINOR, C., APPELLA, E., STAHL, S. J. & GRONENBORN, A. M. (1993) NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. **Science**, 261 : 438-446.
- ORBACH, M. J., PORRO, E. B. & YANOFSKY, C. (1986) Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomil-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. **Mol. Cell. Biol.**, 6(7) : 2452-2461.
- ORIKOSHI, H.; BABA, N.; NAKAYAMA, S.; KASHU, H.; MIYAMOTO, K.; YASUDA, M.; INAMORI, Y. & TSUJIBO, H. (2003). Molecular analysis of the gene encoding a novel cold-adapted chitinase (ChiB) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. **J. Bacteriol.**, 185 : 1153–1160.
- PATIL, R.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. (Review). **Enzyme Microbial Technol.**, 26: 473-483.
- PINTO, A. S., BARRETO, C.C., SCHRANK, A., ULHOA, C J. & VAINSTEIN, M. H. (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Can. J. Microbiol.**, 43 : 322-327.
- PISHKO, E. J.; KIRKLAND, T. N. & COLE, G.T. (1995) Isolation and characterization of two chitinase-encoding genes (*cts1*, *cts2*) from the fungus *Coccidioides immitis*. **Gene**, 167 (1) : 173-177.

- PLATT, A., LANGDON, T., ARST, H. N., JR KIRK, D., TOLLERVEY, D., SANCHEZ, J. M. & CADDICK, M. X. (1996) Nitrogen metabolite signalling involves the C-terminus and the GATA domain of the *Aspergillus* transcription factor AREA and the 3'untranslated region of its mRNA. **EMBO J.**, 15 : 2791-2801.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M.A., KUYVENHOVEN, A., SOEDE, R.D.M., POUWELS, P.H. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. (1990) Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Gene**, 93 : 101-109.
- PUNT, P. J., STRAUSS, J., SMIT, R., KINGHORN, J. R., VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J., SCAZZOCCHIO, C. (1995) The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. **Mol. Cell. Biol.**, 15 : 5688-5699.
- QUESADA-MORAGA, E.; SANTOS-QUIRÓS, R.; VALVERDE-GARCÍA, P. & SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. (2004) Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). **J. Invertebr. Pathol.**, 87 : 51–58.
- RASTA, D. M.; BAUMGARTNER, D.; MAYER, C. & HOLLENSTEIN, G. O. (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**, 64 : 339–366.
- REICHARD, U.; HUNG, C.; THOMAS, P. W. & COLE, G. T. (2000) Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, 68 : 5830-5838.
- REISSING, J., STROMINGER, J. & LELOIR, L. (1955) A modified colorimetric methods for the estimation of N-acetylamino sugar. **J. Biol. Chem.**, 21 : 959-967.
- REYES, F.; CALATAYUD, J. & MARTINEZ, M. J. (1989) Endochitinase from *Aspergillus nidulans* implicated in the autolysis of its cell wall. **FEMS Microbiol. Letts.** 60 : 119-124.
- SAHAI, A. S. & MONOCHA, M. S. (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiol. Lett.**, 11 : 317-338.
- SAITO, A.; FUJII, T.; YONEYAMA, T.; MIYASHITA, K. *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. **J. Bacteriol.**, 180(11): 2911-2914, 1998.
- SAMUELS, R. I.; CHARNLEY, A. K. & REYNOLDS, S. E. (1988) The role of destruxins in the pathogenic of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca Sexta*. **Mycopathology**, 104 : 51-58.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL. D. W. **Molecular cloning: a Laboratory manual**, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.
- SHAHABUDDIN, M., & KASLOW, D.C. (1993) Chitinase: a novel target for blocking parasite transmission? **Parasitol. Today**, 9 : 252-255.

- SCHOLTE, E.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W. & KNOLS, B. G. J. (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* **Malaria J.**, 2(29) : 1-8.
- SCHRANK, A.; BASSANESI, M. C.; PINTO JR, H.; COSTA, S. V.; BOGO, M. R. & SILVA, M. S. N. Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metharhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**, 45: 200-205, 1993.
- SCREEN, S. E.; BAILEY, A.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. & CLARKSON, J. M. (1997) Carbon regulation of cuticle degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a function equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. **Curr. Genet.**, **31**:511– 518.
- SCREEN, S. E.; HU, H. & ST. LEGER, R. J. (2001) Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **J. Invertebr. Pathol.**, 78 : 260–266.
- SILVA, M.V.; SANTI, L.; STAATS, C., C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Res. Microbiol.**, in press.
- SIMONS, R.W. (1988). Naturally occurring antisense RNA control: a brief review. **Gene** 72, 35–44.
- SMITH, M., JESSEE, J., LANDERS, T. & JORDAN, J. 1990. High efficiency bacterial electroporation: 1×10^{10} *E. coli* transformants/ μ g. **Focus**, 12(2) : 38-40.
- 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. (1995) Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, 166: 161-165.
- ST. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M.J. & ROBERTS, D.W. (1994) Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Arch Biochem Biophys** 313:1-7.
- ST. LEGER R. J., CHARLEY, A. K. AND COOPER, R. M. (1986a) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes of insect culture. **J. Invertebr. Pathol.**, 47 : 295-302.
- ST. LEGER R. J., CHARLEY, A. K. AND COOPER, R. M. (1986b) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **J. Gen. Microbiol.**, 132 : 1509-1517.
- ST. LEGER, R. J., COOPER, R.M., CHARLEY, A.K. (1987) Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **J. Gen. Microbiol.**, 133 : 1371-1382.

- ST LEGER, R.J., DURRANDS, P. K., CHARNLEY, A. K., COOPER, R. M. (1988) Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **J Invertebr. Pathol** 52 : 285–293.
- ST. LEGER, R. J., COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. (1991b) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, 58 : 415-426.
- ST. LEGER, R. J., DURRANDS, P. K., CHARNLEY, A. K. (1988) Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **J. Invertebr. Pathol.**, 58 : 415-426.
- ST. LEGER, R. J., GOETTEL, M., ROBERTS, D. W. & STAPLES, R. C. (1991a) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, 58 : 168-179.
- ST. LEGER, R. J. & JOSHI, L. (1997) The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. In: **Manual of Techniques in Insect Pathol.** (Lacey, L., Ed.). p. 367-394. Academic Press, New York.
- ST. LEGER, R. J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M. J., RIZZO, N. W. & ROBERTS, D. W. (1996b) Characterization and ultrastructural localization of chitinase from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62(3) : 907-912.
- ST. LEGER, R. L., JOSHI, L., BIDOCHKA, M. J. & ROBERTS, D. W. (1996a) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 6349-6354.
- ST. LEGER, R. J., ROBERTS, D. W. & STAPLES, R. C. (1990) Electrophoretic detection of multiple protein kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Microbiol.**, 154 : 518- 520.
- ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C. & ROBERTS, D. W. (1993) Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isoenzymes. **J. Invertebr. Pathol.**, 61: 81- 84.
- ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 709-713.
- STAATS, C. C. (2003) **Estudos de transformação no fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae***. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- STAATS, C. C.; SILVA, M. S. N.; PINTO, M. P.; VAINSTEIN, M. H & SCHRANK, A. (2004) The *Metarhizium anisopliae trp1* gene: cloning and regulatory analysis. **Curr. Microbiol.**, 49 : 66-70.
- STREATFIELD, S., TOWES, S. & ROBERTS, C. (1992) Functional analysis of the expression of the 3'-phosphoglycerate kinase *pgk* gene in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Gen. Genet.**, 233 : 231-240.

- SU, Z-Z.; GOLDSTEIN, N. I. & FISHER, P. B. (1998) Antisense inhibition of the PTI-1 oncogene reverses cancer phenotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95 : 1764–1769.
- TAKAYA, N., YANAI, K., HORIUCHI, OHTA, A. & TAKAGI, M. (1995) Analysis of the 3-phosphoglycerate kinase 2 promoter in *Rhizopus niveus*. **Gene**, 152 : 121-125.
- TAKAYA, N., YAMAZAKI, D., HORIUCHI, H., OHTA, A. & TAKAGI, M. (1997) Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. **Biosci Biotechnol Biochem.**, 62(1) : 60-65.
- TEFERA, T. & PRINGLE, K.L. (2003) Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. **J. Invertebr. Pathol.**, 84 : 220–225.
- THOMPSON, C.; MOVVA, N. R.; TIZARD, R.; CRAMEI, R.; DAVIES, J. E.; LAUWEREYS, M & BOTTERMAN, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. **EMBO J.**, 6(9) : 2519 – 2523.
- TULLOCH, H. (1976) The Genus *Metarhizium anisopliae*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 66 : 407-411.
- ULHOA, C. J. & PEDEERBY, J. R. (1991) Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **J. Gen. Microbiol.**, 37 : 2163-2169.
- VIEIRA, J. & MESSING, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp17-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with systemic universal primers. **Gene**, 19 : 259-268.
- VITERBO, A.; HARAN, S.; FRIESEM, D.; RAMOT, O. & CHET, I. (2001) Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum Rifai* TM. **FEMS Microbiol. Lett.**, 200 : 169-174.
- WANG, C.; TYPAS, M. A. & BUTT, T. M. (2002) Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 213: 251-255.
- WANG, C.; SKROBEK, A. & BUTT, T. M. (2003) Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, 85 : 168–174.
- WATANABE, T.; KOBORI, K.; KIYOTAKA, M.; FUJII, T.; SAKAI, H.; UCHITA, M. & TANAKA, H. (1993) Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. **J. Biol. Chem.**, 268: 18567-18572.
- WATTANALAI, R. & WIWAT, C. (2004) Chitinase gene of the dimorphic mycopathogen, *Nomuraea rileyi*. **J. Invertebr. Pathol.**, 85 : 54–57
- WERREN, R. A. J. (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.**, 50 : 183-212.

- WRIGHT, C.; BROOKS, A. & WALL, R. (2004) Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Pest Manag Sci.**, 60(7) : 639-44.
- ZHIOUA, E., BROWING, M., JONHSON, P.W., GINSESBERG, H.S. & LEBRUM, R.A (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetos) to *Ixodes scapularum* (Acari: Ixididae). **J. Parasitol.**, 83(5) : 815-818.
- ZEILINGER, S.; GALHAUP, C.; PAYER, K.; WOO, S. L.; MACH, R. L.; FEKETE, C.; LORITO, M. & KUBICEK, P. (1999) Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. **Fung. Gen. Biol.**, 26 : 131-140.