

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

**ESTUDOS DA FUNÇÃO E REGULAÇÃO DO GENE *CHI2* DO  
FUNGO**

**ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM ANISOPLIAE***

TESE DE DOUTORADO

JULIANO TOMAZZONI BOLDO

PORTO ALEGRE, 2009.

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

**ESTUDOS DA FUNÇÃO E REGULAÇÃO DO GENE *CHI2* DO  
FUNGO ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCHN.)  
SOROKIN (1883)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como Requisito Obrigatório para obtenção do Grau de Doutor.

JULIANO TOMAZZONI BOLDO

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Co-orientador: Prof. Dr. Marilene Henning Vainstein

Defesa realizada aos 30 dias do mês de julho de 2009.

PORTO ALEGRE, 2009.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## Dedicatória

Dedico esta Tese aos meus pais, pois sem eles:

minha vida, impossível teria sido;

meus preceitos, todos distorcidos;

meus ideais, completamente enfraquecidos;

meu afinco, assaz empobrecido;

meu coração, invariavelmente enrijecido.

Obrigado.



## **Agradecimentos**

À Banca Examinadora, Dr. Nilce Maria Martinez-Rossi, Dr. Arnaldo Zaha e Dr. Bergmann Morais Ribeiro, pela disponibilidade de analisar este trabalho, pelas sugestões que melhoraram consideravelmente a qualidade desta Tese e pela oportunidade de discutir Ciência;

À Comissão de Acompanhamento, Dr. Arnaldo Zaha e Dr. Cirano José Ulhôa, pela análise crítica durante toda minha caminhada pela Pós-graduação e pelas idéias e discussões;

À Relatora da Tese, Dr. Irene Schrank, pelas sugestões e por todo tempo e ensinamentos cedidos durante meu período de Pós-graduação;

Ao meu Orientador, Dr. Augusto Schrank, pela oportunidade em trabalhar no laboratório, em acreditar em uma pessoa de fora do seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos durante todo o período, por incentivar sempre e não permitir desistir nunca, por demonstrar seu amor pela ciência e contagiar a todos com ele e, principalmente, pelo grande exemplo de pesquisador e professor que é. Obrigado;

A minha Co-orientadora, Dr. Marilene Henning Vainstein, pelos ensinamentos e por estar sempre aberta a discussões e aberta a sugestões, por ser atenta a detalhes e procurar sempre a perfeição no que faz e pelo exemplo de pesquisadora e administradora;

Às Iniciações Científicas, Ângela “Midas” Junges e Karina Bohrer do Amaral, pela ajuda constante e incansável, pela troca de ensinamentos, pelas pessoas e profissionais maravilhosas que são e, principalmente, pela confiança no trabalho e na minha co-orientação. Obrigado;

Aos colegas do laboratório 217, Broetto, Ângela, Karina, Charley, Bárbara, Juliana, Natália, Lenise, Luciano e Valéria, pelo companheirismo, apoio constante e amizade eterna;

Aos colegas do laboratório 220, Caru, Melissa, Lívia, Charley, Roberta, Karina, Walter, Lucélia, Bianca, Luciana e Luciane, pela amizade e pela ajuda em todos os momentos;

Aos colegas do laboratório 222, Débora, Luciano, Cecagno, Fernando, Shana, Maicon (conterrâneo), pelo apoio e pela amizade;

Aos irmão do caminho, Paulo, Broetto e Charley, pelo companheirismo, amizade eterna. Vocês são a prova de que família é aquela que nós escolhemos também;

Aos meus pais, Clovis e Marivete, por todo o apoio e amor incondicional dados por vocês durante toda a minha vida. Sem vocês, nada disso teria sido possível. Amo vocês!

A minha esposa, Aline, pelo amor constante e apoio. Obrigado por estar do meu lado durante a fase mais importante e difícil do curso e da minha vida. Te amo!;

A todos os meus familiares, pelo apoio e amor;

Aos técnicos, Milton e Paulo, pela ajuda constante e paciência;

Aos secretários, Sílvia e Luciano, pela ajuda e por serem extremamente competentes e indispensáveis.

## Pensamento

### **Something for Nothing**

(letra: Neil Peart; artista: Rush; álbum: 2112 - fevereiro de 1976)

Waiting for the winds of change

To sweep the clouds away

Waiting for the rainbows end

To cast its gold your way

Countless ways

You pass the days

Waiting for someone to call

And turn your world around

Looking for an answer

For the question you have found

Looking for

An open door

**You don't get something for nothing**

**You can't have freedom for free**

**You won't get wise**

**With the sleep still in your eyes**

**No matter what your dreams might be**

**What you own is your own kingdom**

**What you do is your own glory**

**What you love is your own power**

**What you live is your own story**

**In your head is the answer**

**Let it guide you along**

**Let your heart be the anchor**

**And the beat of your song**

## Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	XIII
Lista de Tabelas	XVI
Lista de Figuras	XVII
Resumo	XX
Abstract	XXIII
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Caracterização do fungo <i>M. anisopliae</i>	5
2.2. O processo de infecção de <i>M. anisopliae</i>	9
2.3. Quitinases em fungos	22
2.4. Regulação das quitinases	36
2.5. Processamento diferencial de transcritos em fungos filamentosos	39
3. Contextualização	48
4. Objetivos	49
4.1. Objetivo Geral	49
4.2. Objetivos Específicos	49
5. Capítulo I: Estudo da função do gene <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i>	50

5.1. Introdução	50
5.2. Material e Métodos	51
5.2.1. Soluções e meios de cultivo	51
5.2.1.1. Meio de Cove completo – MCc (COVE 1966)	51
5.2.1.2. Solução de Sais	51
5.2.1.3. Solução de Elementos Traços	52
5.2.1.4. Solução de Tween-80 0,01 % (v/v)	52
5.2.1.5. Meio de Luria-Bertani – LB	52
5.2.1.6. Solução de Glicerol 10 % (v/v)	53
5.2.1.7. Tampão de Tris-EDTA – TE	53
5.2.1.8. Meio de Indução – MI (Covert, 2000)	53
5.2.1.9. Sais MM 2,5 x	54
5.2.1.10. Solução MES 1 M	54
5.2.1.11. Solução de Acetoseríngona 10 mM – AS	54
5.2.1.12. Meio <i>top</i> MM	55
5.2.1.13. Solução de Cefatoxima 100 mg.mL <sup>-1</sup>	55
5.2.1.14. Solução de Glifosinato de Amônio 40 mg.mL <sup>-1</sup>	55
5.2.1.15. Solução de Pré-hibridização	56
5.2.1.16. Solução de SSC 20 x	56

5.2.1.17. Solução de Denhradt 50 x	56
5.2.1.18. Solução de glicose 1 % (m/V)	57
5.2.1.19. Solução de IPTG 0,8 M	57
5.2.1.20. Meio Mínimo – MM	57
5.2.1.21. Tampão PBS 10 X	57
5.2.1.22. Tampão PBS 1X/Tween-20 0,1 % e 0,5 %	58
5.2.1.23. Solução colorimétrica	58
5.2.1.24. Tampão de fixação	58
5.2.1.25. Tampão PIPES 250 mM pH 6,7	58
5.2.1.26. Tampão PEM	59
5.2.1.27. Tampão de digestão	59
5.2.1.28. Tampão de extração	59
5.2.1.29. Tampão de bloqueio	59
5.2.1.30. Solução de PBS 1 x/BSA 3 % (m/V)	60
5.2.1.31. Solução de DAPI 2,5 mg.mL <sup>-1</sup>	60
5.2.2. Microrganismos utilizados	60
5.2.3. Manutenção da linhagem E6 de <i>M. anisopliae</i>	61
5.2.4. Suspensão de conídios	61
5.2.5. Preparação de células eletrocompetentes	61

5.2.6. Preparação e transformação de células quimiocompetentes	62
5.2.7. Manipulação de ácidos nucleicos	63
5.2.8. Agrotransformação	67
5.2.9. Marcação de sonda utilizando fósforo radioativo ( $P^{32}$ )	68
5.2.10. Análise por <i>Southern blot</i>	68
5.2.11. Análise por <i>Northern blot</i>	69
5.2.12. Produção de antisoro	70
5.2.13. Análise por <i>Western blot</i>	71
5.2.14. Atividade total de quitinases (ULHOA & PEBERDY 1991)	72
5.2.15. Atividade específica para endoquitinases	72
5.2.16. Bioensaios	73
5.2.17. Microscopia de imunofluorescência	73
5.3. Resultados	75
5.3.1. Construção de mutantes superexpressando e com expressão nula do gene <i>chi2</i>	75
5.3.2. Caracterização fenotípica dos transformantes T33 e $\Delta 22$	82
6. Capítulo II - Estudo do processamento diferencial do gene <i>chi2</i>	112
6.1. Introdução	112
6.2. Material e Métodos	114

6.2.1. Soluções	114
6.2.1.1. Gel Desnaturante de RNA	114
6.2.1.2. Água tratada com DEPC	114
6.2.1.3. Tampão MOPS 10 x (SAMBROOK & RUSSEL 2001)	115
6.2.1.4. Tampão de pré-hibridização	115
6.2.1.5. SSPE 20 x	116
6.2.1.6. Corante de Ponceau S 0,5 %	116
6.2.1.7. TBS/Tween-20 20 x	116
6.2.1.8. Tampão de bloqueio	117
6.2.1.9. Solução de acetonitrila 50 % e bicarbonato de amônio 50 mM	117
6.2.1.10. Solução de bicarbonato de amônio 25 mM	117
6.2.1.11. Solução de acetonitrila:ácido trifluoroacético 1:1	118
6.2.2. Análise por RT-PCR	118
6.2.3. Análise por <i>Northern blot</i>	119
6.2.4. Marcação de sonda utilizando fósforo radioativo ( $P^{32}$ )	119
6.2.5. Análise por PCR em tempo real (qPCR)	119
6.2.6. Análises de <i>Western blot</i> bidimensional	120
6.2.7. Digestão por Tripsina em Gel e Espectrometria de Massas	121
6.3. Resultados	123



6.3.1. Geração de dois transcritos a partir do gene <i>chi2</i>	123
6.3.2. Síntese de duas proteínas a partir do gene <i>chi2</i>	129
7. Discussão	133
8. Conclusões	146
9. Perspectivas	147
10. Referências utilizadas	148
ANEXOS	166
ANEXO I – Artigo: “Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase <i>chi2</i> Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ”	167
ANEXO II – Artigo: “The endochitinase <i>chi2</i> gene of the biocontrol fungus <i>Metarhizium anisopliae</i> affects its virulence towards the cotton stainer bug <i>Dysdercus peruvianus</i> ”	173
Anexo III – Artigo: “Evidence of alternative splicing of the <i>chi2</i> gene of <i>Metarhizium anisopliae</i> ”	184
Anexo IV – Currículo Lattes (até agosto de 2009)	206

## Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

%	porcento
ANOVA	Análise de Variância
ATMT	Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BSA	albumina sérica bovina
CBD	<i>Cellulose Binding Domain</i> (domínio de ligação à celulose)
cDNA	DNA complementar
ChBD	<i>Chitin Binding Domain</i> (domínio de ligação à quitina)
Conídios.mL <sup>-1</sup>	conídios por mililitro
C-terminal	Carbóxi-terminal
d	dias
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dCTP	dideoxicitosina
DEPC	dimetilpirocarbonato
DMAB	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	dideoxynucleotídeo
DO	densidade óptica
EDTA	sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> (etiquetas de seqüências expressas)
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	grama ou força gravitacional
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glicosamina
GlcNAc•min <sup>-1</sup>	monômeros de GlcNAc por minuto
GlcNAc-6-P	<i>N</i> -acetil-D-glicosamina-6-fosfato
gm	miligrama
h	hora
IM	meio de indução

IPTG	isopropiltiogalato
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (espaçador interno transcrito)
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
M	molar
m/V	massa por volume
MC	meio de Cove
MCc	meio de Cove completo
MES	ácido 2-( <i>N-Morfolino</i> )etanosulfônico
MEV	microscopia Eletrônica de Varredura
mg.mL <sup>-1</sup>	miligrama por mililitro
min	minuto
mL	mililitro
mM	mili Molar
MM	meio mínimo
MOPS	ácido 3-( <i>N-Morfolino</i> )propanosulfônico
MPa	mega Pascal
mRNA	RNA mensageiro
ms	milissegundo
MS/MS	Espectrometria de massas com análise em tandem
N	normal
ng	nanogramas
nt	nucleotídeo
N-terminal	Amino-terminal
°C	graus Celsius
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (fase aberta de leitura)
P <sup>32</sup>	isótopo radioativo 32 do elemento fósforo
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial de hidrogênio

PI	ponto isoelétrico
pmol/mL.min.µg <sup>-1</sup>	picomol por mililitro por minuto por micrograma de proteína total
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase em tempo real)
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa)
s	segundo
SOD	Superóxido Dismutases
TL <sub>50</sub>	tempo letal mediano
TL <sub>90</sub>	tempo letal 90 %
U.µg <sup>-1</sup>	unidades de enzima por micrograma
U/µg.proteína <sup>-1</sup>	unidade de enzima por micrograma de proteína total
uORF	<i>upstream Open Reading Frame</i> (fase aberta de leitura à montante)
UTR	<i>Untranslated Region</i> (região não-traduzida)
UV	ultravioleta
v	volts
v.cm <sup>-1</sup>	volts por centímetro
V/V	volume por volume
WT	<i>Wild Type</i> (tipo selvagem)
x	vezes
µg	micrograma
µg.mL <sup>-1</sup>	micrograma por mililitro
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
µCi	micro Curie
µmol	micromol

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Espécies e variedades pertencentes ao gênero <i>Metarhizium</i> .	8
<b>Tabela 2.</b> Exemplos de genes que sofrem <i>splicing</i> alternativo em fungos.	41
<b>Tabela 3.</b> Exemplos de genes que sofrem <i>splicing</i> alterado em fungos.	45
<b>Tabela 4.</b> Listagem de <i>primers</i> utilizados.	66
<b>Tabela 5.</b> Valores de TL <sub>50</sub> e TL <sub>90</sub> das linhagens de <i>M. anisopliae</i> avaliadas em bioensaios utilizando o inseto <i>D. peruvianus</i> .	88
<b>Tabela 6.</b> Identificação de proteínas por análise de MS/MS evidencia a síntese de duas diferentes proteínas a partir do gene <i>chi2</i> .	132

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1:</b> Aspectos morfológicos de <i>M. anisopliae</i> .	6
<b>Figura 2.2:</b> Ciclo de infecção de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	10
<b>Figura 2.3:</b> Molécula de quitina.	23
<b>Figura 2.4:</b> Estrutura da família 18 de quitinases fúngicas.	26
<b>Figura 2.5:</b> Filogenia de alguns representantes de quitinases fúngicas.	27
<b>Figura 2.6:</b> Cristalografia de quitinases de fungos da família 18.	30
<b>Figura 5.1:</b> Construção do <i>cassette</i> de superexpressão do gene <i>chi2</i> .	64
<b>Figura 5.2:</b> Inativação do gene <i>chi2</i> .	67
<b>Figura 5.3:</b> Integração do <i>cassette</i> de resistência a glifosinato de amônio no genoma de linhagens transformantes de <i>M. anisopliae</i> obtidas por ATMT utilizando o vetor pPZP:: <i>chi2</i> :: <i>bar</i> .	76
<b>Figura 5.4:</b> Integração do <i>cassette</i> de superexpressão do gene <i>chi2</i> no genoma de linhagens transformantes de <i>M. anisopliae</i> obtidas por ATMT utilizando o vetor pPZP:: <i>chi2</i> :: <i>bar</i> .	77
<b>Figura 5.5:</b> Integração do <i>cassette</i> de interrupção do gene <i>chi2</i> no genoma de linhagens transformantes de <i>M. anisopliae</i> obtidas por ATMT utilizando o vetor pPZP:: $\Delta$ <i>chi2</i> :: <i>bar</i> .	79

<b>Figura 5.6:</b> Integração homóloga do <i>cassette</i> de disrupção do gene <i>chi2</i> no genoma de linhagens transformantes de <i>M. anisopliae</i> obtidas por ATMT utilizando o vetor pPZP:: $\Delta$ chi2::bar.	80
<b>Figura 5.7:</b> Integração dos <i>cassettes</i> de superexpressão e disrupção do gene <i>chi2</i> no genoma de <i>M. anisopliae</i> .	81
<b>Figura 5.8:</b> Expressão do gene <i>chi2</i> .	83
<b>Figura 5.9:</b> Expressão da quitinase CHI2.	85
<b>Figura 5.10:</b> Atividade de quitinases total secretadas por diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i> .	86
<b>Figura 5.11:</b> Atividade específica de endoquitinases secretadas por diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i> .	87
<b>Figura 5.12:</b> Mortalidade de <i>D. peruvianus</i> expostos à linhagem selvagem e aos transformantes T33 e $\Delta$ 22 de <i>M. anisopliae</i> .	89
<b>Figura 5.13:</b> Localização sub-celular da enzima CHI2 de <i>M. anisopliae</i> linhagem E6 hibridizada com antissoro-anti-CHI2.	90
<b>Figura 5.14:</b> Localização sub-celular da enzima CHI2 de <i>M. anisopliae</i> transformante T33 hibridizada com antissoro-anti-CHI2.	98
<b>Figura 5.15:</b> Localização sub-celular da enzima CHI2 de <i>M. anisopliae</i> transformante $\Delta$ 22 hibridizada com antissoro-anti-CHI2.	108
<b>Figura 6.1:</b> Geração de dois transcritos a partir do gene <i>chi2</i> .	124

<b>Figura 6.2:</b> A comparação das seqüências das duas espécies de mRNA demonstra a retenção do segundo íntron.	125
<b>Figura 6.3:</b> Padrão de transcrição das duas espécies de transcritos oriundas do gene <i>chi2</i> .	126
<b>Figura 6.4:</b> Análise quantitativa da expressão do gene <i>chi2</i> e de suas duas formas de transcritos.	127
<b>Figura 6.5:</b> Síntese de duas proteínas a partir do gene <i>chi2</i> e análises <i>in silico</i> .	130
<b>Figura 6.6:</b> Duas proteínas são sintetizadas pelo gene <i>chi2</i> .	131



## Resumo

O fungo *Metarhizium anisopliae* é amplamente estudado como modelo da interação parasita-hospedeiro em nível molecular. Este fungo tem a capacidade de infectar artrópodes suscetíveis de forma direta através de suas cutículas. Para tanto, o fungo, utiliza-se de um processo multifatorial envolvendo pressão mecânica e secreção de hidrolases. Dentre elas, destacam-se as quitinases, envolvidas tanto nos processos de morfogênese do próprio organismo quanto em processos de patogenia e nutrição. Estudos avaliando a expressão de genes possivelmente envolvidos no processo de infecção de hospedeiros ajudam a esclarecer o processo em si. Assim, quitinases são alvos de interesse para estudos de regulação e função. Neste sentido, estratégias para a geração de transformantes que não expressem ou que expressem genes em níveis aumentados são utilizados e aplicados em trabalhos deste e de outros grupos de pesquisa a fim de determinar-se o papel de genes em determinados processos. Este trabalho envolve o estudo do gene *chi2*, que codifica para uma quitinase (CHI2) de 42 kDa, cuja seqüência fora previamente caracterizada. Inicialmente, análises de regulação demonstraram que este gene é altamente regulado dependendo da fonte de carbono disponibilizada. Para estudar a função da quitinase CHI2, foram gerados mutantes nulos para o gene *chi2* ( $\Delta$ chi2) utilizando-se transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), com taxa de recombinação homóloga dentre os transformantes de 1,3%. Experimentos de *Western blot* demonstraram a ausência de expressão de CHI2 nos transformantes. Assim como para a deleção, a superexpressão de *chi2* (T33) foi realizada por Agro-transformação e análises de *Western blot*

demonstraram a expressão aumentada e não regulada de CHI2. Bioensaios utilizando o inseto *Dysdercus peruvianus* demonstram diferenças de tempo letal mediano e tempo letal 90% (TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub>) entre as linhagens transformantes e selvagem, sendo maiores para o mutante sem expressão de *chi2*  $\Delta$ 22 e menores para o transformante superexpressando *chi2* T33. Para avaliar a localização celular de CHI2, antisoro foi produzido em coelhos. Análises de microscopia óptica de imunofluorescência demonstraram diferenças marcantes na distribuição da enzima entre as linhagens selvagem e transformadas. Na linhagem selvagem, em hifas diferenciadas em apressório, a proteína encontra-se associada à parede celular, nas regiões de germinação do esporo, na extremidade da hifa, exatamente no ponto de formação do apressório e em todo o apressório, mas ausente no citoplasma e nos esporos. Já em hifas não diferenciadas, CHI2 apresenta-se associada à parede, mas sem pontos específicos e, portanto, difusa no citoplasma. Este fato evidencia possível rota de secreção. As linhagens deletadas não apresentaram fluorescência, indicando a ausência da proteína, sem nenhuma alteração fenotípica aparente. Portanto, CHI2 não teria papel na morfogênese. Linhagens superexpressando CHI2 não demonstraram localização específica de CHI2, cuja fluorescência foi mais intensa e difusa pela célula. Nestas linhagens, a quitinase CHI2 também pode ser detectada na parede celular dos conídios. Nenhuma alteração morfológica aparente foi detectada nos mutantes de superexpressão. Além disso, o gene *chi2* sofre processos diferenciais de *splicing*, gerando duas espécies de transcritos. Uma delas é totalmente processada e outra retém o segundo íntron, como demonstrado por ensaios de *Northern blotting*. Demonstramos por ensaios de *Western blot* em géis SDS-

PAGE-2D e espectrometria de massas que as duas proteínas diferentes são traduzidas a partir destes transcritos. Em trabalhos posteriores, transformantes carregando deleção ou superexpressando as diferentes formas poderão auxiliar no entendimento da função das formas de chitinase geradas e contribuirão para o conhecimento mais aprofundado da função das endoquitinases nos processos celulares.

## Abstract

*Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (1883) is a filamentous fungi widely studied as a model for host-parasite interactions on its molecular basis. This fungus has the ability to infect susceptible arthropods in a direct manner through the host cuticle. The fungus uses a complex process involving mechanic pressure and secretion of hydrolases, among them chitinases, which act either in morphogenesis processes as in pathogenesis and nutrition. Studies that evaluate the expression of genes possibly involved in the pathogenesis process may aid to clarify the process itself. Thus, chitinases genes become the aim for regulation, deletion and overexpression studies. Strategies for generating transformants lacking or overexpressing genes in levels above wild strains are currently being used and already applied in researches of our and other groups. This work involves the study of the *chi2* gene, of which sequence has been already characterized and codes for a 42 kDa chitinase (CHI2). Initially, regulation analysis showed that this gene is tightly regulated depending on the carbon source. The null *chi2* mutants ( $\Delta$ chi2) were constructed by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) and the homologous recombination rate was 1.3%. Western blotting assays demonstrated no CHI2 expression by the null transformants. The overexpression of *chi2* (T33) was performed using ATMT and Western blotting analysis demonstrated non regulated high levels of CHI2 expression. Bioassays using the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* demonstrated distinct TL50 and TL90 values among the wild and modified strains, which were higher for  $\Delta$ chi2 and lower for T33. In order to evaluate the cellular localization of CHI2,

antiserum was produced in rabbits. Optical immunofluorescence assays demonstrated significant differences in the enzyme distribution among the wild and transformed strains. In the wild strain, in a presorium differentiated hyphae, the protein is associated with the cell wall, at the germination spot of the conidia, at the distal extremity of the hyphae, exactly at the presorium formation spot, all over the presorium and absent at the cytoplasm and conidia. In non differentiated hyphae, CHI2 is also associated with the cell wall, without specific locations and diffused throughout the cytoplasm. Possibly, CHI2 is addressed to secretion. The null strains did not present fluorescence as expected, confirming the absence of the protein, but no morphological alterations were observed. The CHI2 overexpressing strains did not show specific location for CHI2 protein, and the fluorescence reached higher levels and diffused through the cell. Also, CHI2 was detected at the conidia cell wall. No apparent morphological changes were detected in both CHI2 null and overexpressing strains. Thus, CHI2 do not have a role in morphogenesis. It was also observed that this gene presents different patterns of splicing, generating two transcript species. One of them is completely processed, while a second one retains a 72 base pairs intron, as demonstrated by Northern blotting assays. Mass spectrometry demonstrated the synthesis of two different proteins from the transcripts. In future works, transformants carrying deletions or overexpressing the distinct forms of the protein will provide new insights about their function and will improve the knowledge about the overall function of endochitinases throughout the cell development.

## 1. Introdução

O estudo e a análise da função gênica ocupam um papel central na Biologia Molecular da era pós-genômica (JANITZ 2007; MEDINI *ET AL.*, 2008). Além da descrição e detalhamento da função, a organização dos genes nos genomas, a qual afeta diretamente o controle da expressão gênica, e o estudo dos mecanismos de processamento fazem parte das estratégias para desvendar o funcionamento de redes metabólicas antes total ou parcialmente oclusas por falta de informação. Cerca de 25 genomas de fungos estão descritos e outros tantos em andamento, provendo uma grande quantidade de informações. Tendo em vista o acesso a estas informações e às novas tecnologias e ao avanço da bioinformática, o estudo global dos perfis de mRNA, proteínas e metabólitos está em pleno desenvolvimento. Estas novas tecnologias permitem caracterizar interações patógeno-hospedeiro e a própria patogenia em níveis moleculares (BHADAURIA *ET AL.*, 2007).

O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* é, atualmente, um dos fungos entomopatógenos mais bem caracterizados, sendo modelo para a compreensão das interações patógeno-hospedeiro em invertebrados. Estudos envolvendo *M. anisopliae* visam esclarecer o processo de infecção deste fungo nos seus hospedeiros, buscando genes e proteínas essenciais nas diferentes fases da patogenia. A via principal para o início da infecção é a degradação, rompimento e penetração através da cutícula de um hospedeiro suscetível. Este processo inicia com a adesão das partículas infectivas do fungo (conidiósporos), sobre a cutícula destes hospedeiros. Há uma reorganização na expressão gênica e uma variedade de hidrolases é secretada, bem como ocorre a síntese de proteínas envolvidas com o remodelamento da parede

celular fúngica para a formação de estruturas especializadas que auxiliarão na penetração (SHAH & PELL 2003).

Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem focado seus estudos em caracterizar genes e enzimas cuja função seria crucial nos eventos da patogenicidade (MORAES *ET AL.*, 2003; DA SILVA *ET AL.*, 2005; BARATTO *ET AL.*, 2006; STAATS *ET AL.*, 2007). Uma classe de enzimas com particular interesse é a das quitinases, uma vez que a cutícula dos artrópodes é rica em fibras de quitina embebidas em uma matriz protéica (PEDRINI *ET AL.*, 2007). Além disso, a própria parede do fungo possui quitina, conferindo rigidez. Desta forma, as quitinases não só teriam um papel fundamental atuando diretamente na solubilização da quitina presente no hospedeiro, mas também teriam um papel tão ou mais importante no processo de morfogênese, indispensável para a infecção. Portanto, estas enzimas teriam, pelo menos, duas funções principais, atuando nos processos de diferenciação celular e na solubilização de quitina exógena com o objetivo de prover nutrição à célula e permitir o acesso do fungo à fonte nutricional representada pelo hospedeiro.

Em 25 genomas de fungos analisados foram encontradas de 10 até 25 potenciais quitinases utilizando o algoritmo de comparação TBLASTN. Todas são representantes da família 18 das glicosil hidrolases e podem ser separadas, com base em sua seqüência de aminoácidos, em três subgrupos (A, B e C). Esta é uma diversidade inesperada para enzimas relativamente simples e que tem a mesma característica funcional – degradar quitina. Embora muitas quitinases e seus genes correspondentes tenham sido estudados, apenas após as análises genômicas ficou comprovada a complexidade deste sistema. Ainda não é possível responder se esta variedade de quitinases é

apenas redundante ou se existe uma especialização extrema destas enzimas nos fungos (SEIDL 2008).

*Metarhizium* e outros fungos entomopatogênicos representam um modelo importante na descrição das funções celulares das diferentes quitinases. Esses organismos, além de toda participação das quitinases no seu desenvolvimento vegetativo, ainda apresentam processos importantes de diferenciação, quando ocorrem grandes alterações na parede celular e produção de quantidades muito expressivas de quitinases extracelulares que possibilitam ou facilitam a infecção de hospedeiros artrópodes. Pelo menos seis diferentes bandas de atividade de quitinase são detectadas por zimogramas realizados utilizando sobrenadantes de cultivo de *M. anisopliae* em condições controladas que mimetizam o processo de infecção (DA SILVA ET AL., 2005). Em trabalhos anteriores (BARATTO ET AL., 2003; BARATTO ET AL., 2006), uma quitinase de 42 kDa foi estudada quanto a sua regulação e a caracterização do gene que a codifica (*chi2*) foi realizada. O gene possui dois íntrons, de 211 e 72 pb, e a sua expressão é regulada de acordo com a fonte de carbono disponível. Também foi demonstrado que este gene possui homologia com outras quitinases de *T. harzianum*, um micopatógeno, que, comprovadamente, estão envolvidas diretamente na aquisição de nutrientes oriundos da degradação da quitina presente na parede celular de outros fungos (SEIDL ET AL., 2005; BARATTO ET AL., 2006).

Portanto, o gene *chi2* e a quitinase correspondente tornam-se alvos interessantes para estudos mais aprofundados da sua função no processo de infecção de *M. anisopliae*. Neste trabalho, damos continuidade ao estudo das funções da quitinase CHI2 descrevendo a construção de mutantes nocaute e



de transformantes que superexpressam o gene *chi2* utilizando o sistema de Agro-transformação (ATMT) estabelecido em nosso grupo (STAATS *ET AL.*, 2007). Caracterizamos estes mutantes quanto à síntese da quitinase CHI2, avaliando a patogenicidade das linhagens construídas em bioensaios utilizando como hospedeiro o inseto *Dysdercus peruvianus* e localizando *in situ* a proteína CHI2 por microscopia óptica de imunofluorescência, auxiliando, assim, na compreensão da função da quitinase CHI2 na biologia de *M. anisopliae*.

A análise do perfil transcricional do gene *chi2* por RT-PCR demonstrou a síntese de dois transcritos distintos. A comprovação da síntese destes transcritos, bem como das proteínas oriundas dos transcritos, é explorada e discutida e adiciona um nível a mais de complexidade ao sistema de quitinases em fungos.

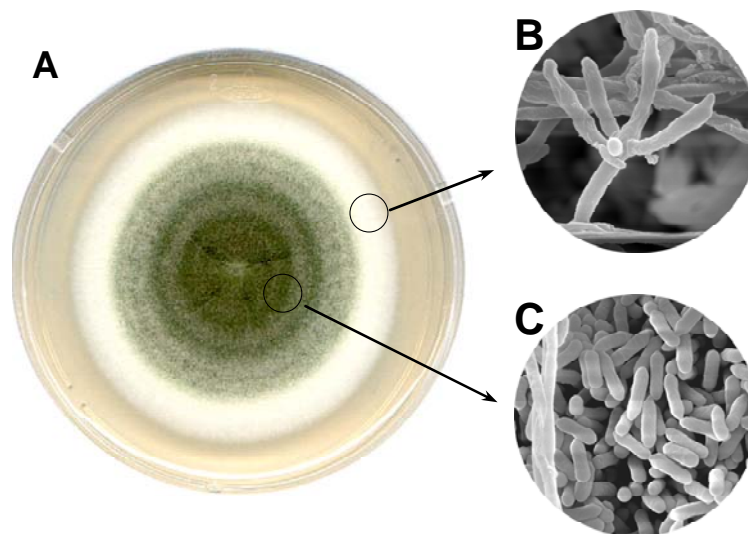
## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Caracterização do fungo *M. anisopliae*

Inicialmente identificado como *Entomophthora anisopliae* por Metchnikoff em 1883, *M. anisopliae* é um fungo filamentosos que possui a capacidade de infectar e ser letal para cerca de 300 espécies de artrópodes, incluindo desde insetos até ácaros (ROBERTS & ST LEGER 2004). Além de parasitar artrópodes pragas da pecuária e agricultura, como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FRAZZON ET AL., 2000) e o gafanhoto *Schistocerca gregaria* (TOUNOU ET AL., 2008), respectivamente, *M. anisopliae* também tem a capacidade de controlar vetores de doenças humanas, como o transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* (SCHOLTE ET AL., 2007), da malária *Anopheles gambiae* (SCHOLTE ET AL., 2006), da doença de Chagas *Triatoma infestans* (LUZ ET AL., 1998) e a mosca tsé-tsé *Glossina* sp. (KAAYA & MUNYINYI 1995).

Devido a estas características e a sua resistência a fatores ambientais, como luz ultravioleta de diversos comprimentos de onda (BRAGA ET AL., 2006), temperatura, uma vez que o fungo pode desenvolver-se em uma faixa de 15 °C até 45 °C (ARRUDA 2005; LI & FENG 2009), e pH, variando de valores de 2,0 a 8,5 (ARRUDA 2005), *Metarhizium* vem sendo utilizado como agente de controle biológico de inúmeras pragas (LORD 2005).

A morfologia de conídios e da colônia de *M. anisopliae* é característica e permite sua identificação em condições de laboratório. A espécie *M. anisopliae*, a qual inclui a linhagem selvagem utilizada neste trabalho, é filamentosa, possuindo micélio hialino em meio de cultura específico (Fig. 2.1 A). Assexuadamente, produz conídios pigmentados verde escuros, fato que auxilia na proteção à luz UV, dispostos em coluna na extremidade dos conidióforos. São cilíndricos, com tamanhos que variam de 3,5 a 1,8  $\mu\text{m}$  de comprimento (ALVES 1998) (Fig. 2.1 B e C). Em 2001, Liu e colaboradores isolaram a fase teleomórfica *Metacordyceps brittlebankisoides* (anamorfo *M. anisopliae* var. *majus*) (YI LIU ET AL., 2001). Até então, apenas seus ciclos de reprodução assexuada e parassexual, por meio de heterocariose, eram conhecidos (ARRUDA 2005).



**Figura 2.1. Aspectos morfológicos de *M. anisopliae*.** Colônia após 28 dias de crescimento em meio artificial a 28 °C. **A** Micélio branco pode ser observado no bordo da colônia. Em **B**, formação de conidióforos. Em **C**, produção de esporos. A montagem é de autoria de C. C. Staats (STAATS, 2007). As imagens de MEV são de autoria de W. Arruda (ARRUDA ET AL., 2005).

Quanto a sua classificação, o gênero *Metarhizium* está inserido dentro do domínio *Eukarya*, supergrupo *Unikonta*, grupo *Opisthokonta*, subgrupo *Fungi* superfilo *Dikarya*, filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales*, família *Claviceptaceae*. Em 2001, *Metarhizium* foi reclassificado e pertence ao filo *Ascomycota*, quando Liu e colaboradores isolaram sua fase teleomórfica, *M. brittlebankisoides* (Liu) Sung, cujo anamorfo é a espécie *M. anisopliae* var. *majus* (YI LIU ET AL., 2001). Além deste, outros três teleomorfos foram identificados, *Metacordyceps campsosterni* (Liang) Sung (SUNG ET AL., 2007), *Metacordyceps taii* (Zhang) Sung (SUNG ET AL., 2007), cujo correspondente anamorfo é a espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Um novo teleomorfo foi recentemente identificado, *Metacordyceps chongqingensis* (YANG ET AL., 2009). Ainda, mais recentemente, foi proposta uma nova classificação das espécies pertencentes ao gênero *Metarhizium*. A nova classificação eleva as variedades *acridum* e *majus* à espécies, sugere sies novas espécies (*Metarhizium brunneum*, *Metarhizium blobosum*, *Metarhizium guizhouense*, *Metarhizium lepidotae*, *Metarhizium pingshaense* e *Metarhizium robersii*) e reclassifica *Metarhizium taii* como pertencente a *Metarhizium guizhouense*. A Tabela 1 mostra as espécies e variedades pertencentes ao gênero *Metarhizium*.

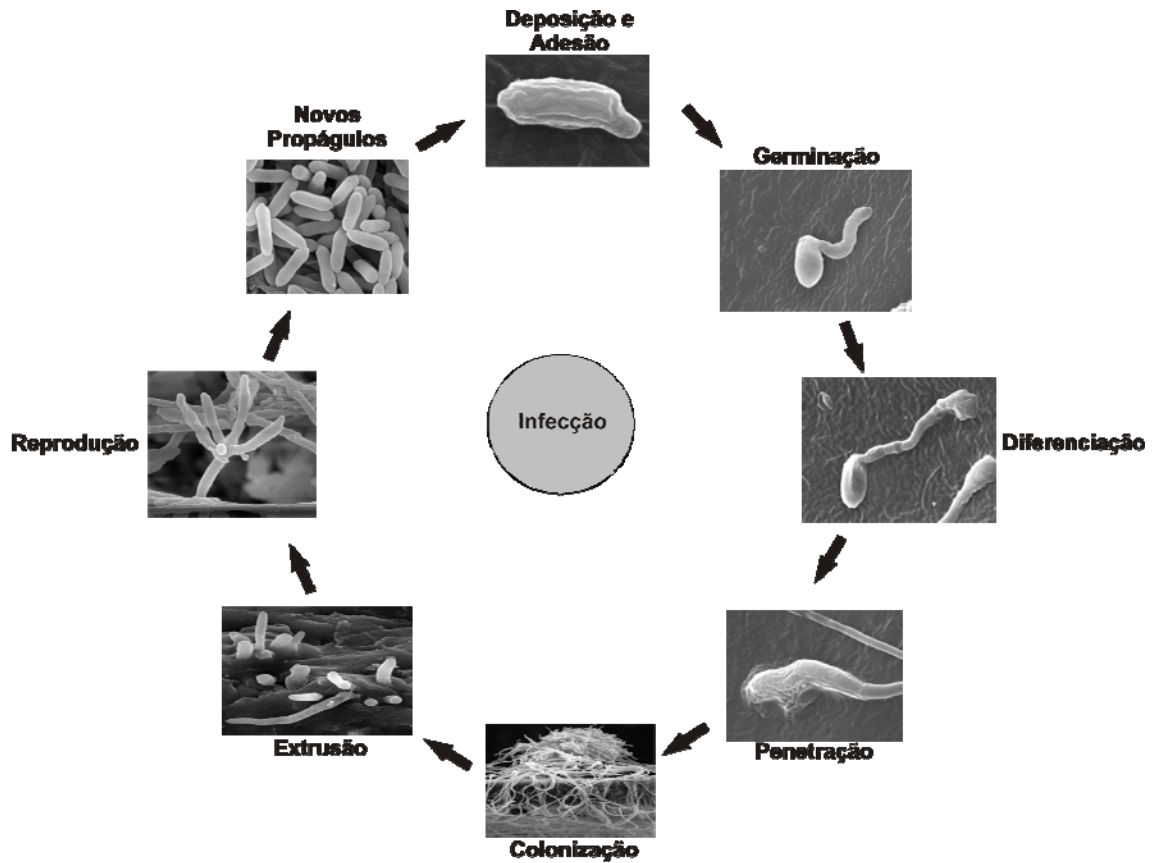
**Tabela 1. Espécies e variedades pertencentes ao gênero *Metarhizium*.**

<b>Espécies</b>	<b>Variedades</b>	<b>Referências</b>
<i>Metarhizium album</i>	-	DRIVER ET AL., 2000
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>acridum, anisopliae, dcjhyium, lepidotum, majus</i>	DRIVER ET AL., 2000; DONG ET AL., 2007
<i>Metarhizium flavoviride</i>	<i>flavoviride, minus, novazelandicum, pemphigum, Tipo E</i>	DRIVER ET AL., 2000
<i>Metarhizium taii</i>	<i>chongqingensis</i>	YANG ET AL., 2009
<i>Metarhizium acridum</i>		
<i>Metarhizium anisopliae</i>		
<i>Metarhizium brunneum</i>		
<i>Metarhizium blobosum</i>		
<i>Metarhizium guizhouense</i> ( <i>M. taii</i> )	-	BISCHOFF et al., 2009
<i>Metarhizium lepidotae</i>		
<i>Metarhizium majus</i>		
<i>Metarhizium pingshaense</i>		
<i>Metarhizium robertsii</i>		

## 2.2. O processo de infecção de *M. anisopliae*

O ciclo de infecção de *M. anisopliae* é bem descrito. Diferentemente de outros entomopatógenos, como vírus e bactérias, que necessitam ser ingeridos pelos hospedeiros para que o patógeno possa estabelecer a infecção, os fungos entomopatogênicos penetram ativamente através da cutícula de seus hospedeiros artrópodes (CLARKSON & CHARNLEY 1996). O ciclo de infecção inicia com a deposição dos conídios sobre a cutícula de um hospedeiro suscetível; secreção de mucilagens para adesão (adesinas); germinação; modificação da extremidade distal da hifa em apressório; penetração da hifa por pressão de turgor, auxiliada pela secreção de enzimas hidrolíticas; colonização do hospedeiro; extrusão de hifas; e reprodução do fungo, formando novos propágulos infectivos (ARRUDA *ET AL.*, 2005; SEXTON & HOWLETT 2006) (Fig. 2.2).

Analisando o habitat de *Metarhizium* podemos inferir sobre como o fungo se mantém na natureza. De acordo com St Leger e colaboradores (2008), baseado em trabalhos anteriores (HU & ST LEGER 2002), a rizosfera é o local preferencial de desenvolvimento vegetativo de *Metarhizium*. Isto permite *Metarhizium* manter-se no ambiente mesmo em períodos nos quais não ocorra a infecção de hospedeiros (ST LEGER 2008). Neste ambiente, o fungo encontra nutrição e ficaria menos exposto à luz UV.



**Figura 2.2: Ciclo de infecção de *M. anisopliae* sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; ARRUDA *ET AL.*, 2005) demonstrando as fases da infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros: deposição e adesão de conídios, germinação, diferenciação da hifa em apressório, penetração, colonização, extrusão de hifas, reprodução assexuada do fungo e produção de novos propágulos.

A deposição dos conídios sobre os artrópodes ocorre ao acaso no ambiente natural. Porém, apenas a combinação de hospedeiros suscetíveis e propágulos viáveis é que desencadeia o processo de infecção. A estrutura e a composição química da superfície da cutícula do hospedeiro são fatores-chave para a adesão do conídio. Contudo, a seqüência de eventos que culmina com a penetração do fungo depende essencialmente de sinais químicos apropriados (PEDRINI *ET AL.*, 2007). Uma vez reconhecidos estes sinais por hidrofobinas,

proteínas hidrofóbicas presentes na superfície dos esporos (BIDOCHKA *ET AL.*, 2001; FANG *ET AL.*, 2007), o processo de penetração é iniciado. A cutícula do inseto constitui uma barreira a ser transposta. É formada de três camadas básicas: epicutícula, procutícula e a epiderme (JUAREZ & FERNANDEZ 2007). Logo que há o reconhecimento da superfície pelo fungo, ocorre a secreção de uma substância micilaginosa cuja principal função seria auxiliar na adesão do conídio (ZACHARUK 1971), posteriormente identificada como secreção de proteínas chamadas adesinas. Nesta fase, a produção destas proteínas do tipo MAD1 também é essencial para a adesão, uma vez que mutantes nulos para o gene *mad1*, que codifica adesinas, são incapazes de realizar a aderência à superfície de hospedeiros, além de terem a germinação retardada e não formarem blastosporos (WANG & ST LEGER 2007b).

Como a superfície da epicutícula é composta primariamente de lipídios e ceras, ela torna-se extremamente recalcitrante a danos físicos e impede o acesso de hidrolases à cutícula propriamente dita (HADLEY 1981). A secreção de lipases foi demonstrada em *Metarhizium* em condições que simulam a infecção dos hospedeiros (SILVA *ET AL.*, 2004) e é possível que estas enzimas rompam a camada hidrofóbica de ceras e permitam o acesso de outras hidrolases diretamente sobre a matriz composta por quitina e proteínas da procutícula. Dentro deste panorama, podemos dividir a fase de adesão em três etapas: (1) adsorção dos propágulos do fungo na superfície cuticular; (2) adesão de conídios pré-germinantes na epicutícula e (3) germinação do fungo e desenvolvimento sobre a cutícula, até a formação de apressório para o início da fase de penetração.



A diferenciação das hifas, em sua porção distal, em apressório é uma das alterações morfológicas cruciais e mais características do início da penetração de *Metarhizium* em seus hospedeiros. Nesta fase, há a expressão aumentada do gene *mpl1*, responsável pela síntese de perilipinas. As perilipinas são proteínas que se associam às gotículas de lipídeos de carga neutra, ocluindo-as e impedindo sua degradação por lipases. Desta forma, há acúmulo de lipídeos na célula. Mutantes nulos para este gene têm diminuição na formação de apressório e da patogenicidade, pois a redução de lipídeos acumulados dentro da célula causa a perda da retenção de solutos na célula, diminuindo consideravelmente a pressão osmótica intracelular, ou pressão de turgor (WANG & ST LEGER 2007a). A enzima proteína cinase A (PKA), que atua em inúmeros processos celulares, também pode estar envolvida na formação do apressório, uma vez que mutantes nulos para o gene *MaPKA1* ( $\Delta$ *MaPKA1*) mostraram retardo na formação desta estrutura e os apressórios formados eram defectivos em relação à manutenção da adesão dos conídios e penetração das cutículas. Além disso, a interrupção deste gene levou à regulação negativa de 244 genes relacionados à degradação da cutícula, manutenção de pH, regulação de ciclo celular, entre outros, e à regulação positiva de uma protease (gene *pr1D*; FANG ET AL., 2009). É provável que a falta desta enzima cause a diminuição da pressão de turgor, como ocorre em *Magnaporthe grisea* (XU & HAMER 1996), e afete negativamente a expressão de tetraspaninas, proteínas que contem quatro domínios transmembrana e provavelmente responsáveis pelo reconhecimento de sinais extracelulares, essenciais para a formação do grampo de penetração em *M. grisea* (CLERGEOT ET AL., 2001). Outro fator, a concentração de açúcares, auxilia o

apressório aumentando a pressão de turgor. Esta pressão exerce força mecânica sobre a cutícula, podendo chegar a 10 MPa (FANG *ET AL.*, 2009), e pressiona a cutícula no sentido da penetração do fungo.

Considerando a fase de adesão fundamental para o sucesso da patogenia, e levando em consideração a possibilidade de uso de *Metarhizium* em programas de controle biológico, é importante avaliar a especificidade de *Metarhizium* em causar patogenia em diferentes artrópodes. De acordo com Wang & Leger (2005a,b), é altamente improvável haver a secreção de um único sinal químico ao qual todas as variedades de *Metarhizium* responderiam. A linhagem ARSEF 324, por exemplo, é específica para o gafanhoto *S. gregaria* e não inicia o processo de infecção em qualquer outro hospedeiro testado. Frações de diferentes grupos de moléculas, extraídas da cutícula de *S. gregaria* com diferentes solventes orgânicos, têm efeitos distintos na formação de apressório e de grampo de penetração nesta linhagem. Isto sugere que na cutícula dos hospedeiros apenas algumas moléculas são capazes de ser reconhecidas pelo fungo e, assim, desencadear o processo de infecção (WANG & ST LEGER 2005a).

Contrariamente, outras linhagens tendem a ser mais generalistas e infectam várias espécies de artrópodes, com diferentes níveis de patogenicidade (FRAZZON *ET AL.*, 2000; DE MELO *ET AL.*, 2008; JIN *ET AL.*, 2008; MAKETON *ET AL.*, 2008; TAVASSOLI *ET AL.*, 2008). Isso se deve às diferenças genéticas entre os isolados. Recentemente, uma análise da expressão gênica entre linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* que são generalistas ou especialistas em relação à infecção de hospedeiros artrópodes mostraram diferenças importantes na

seqüência de alguns genes ou mesmo sua ausência. O gene da endoquitinase CHI2 (alvo de estudo desta Tese), por exemplo, é ausente na linhagem especializada Ma443 e presente na linhagem generalista Ma2575 (WANG *ET AL.*, 2009). Estes resultados sugerem que a presença ou ausência de determinados genes reduzem ou impedem a capacidade do fungo em infectar certos hospedeiros.

Em um trabalho cujo gene *cag8*, responsável pelo controle da expressão da proteína sinalizadora G (*Regulators of the G protein signalling* – RGS), foi deletado, observou-se o crescimento reduzido e hifas aéreas sem conidiação, além da interrupção da síntese de hidrofobinas. Neste estudo, os mutantes  $\Delta$ *cag8* mostraram patogenicidade similar à linhagem selvagem, pois, uma vez dispersos na hemolinfa, os blastosporos injetados artificialmente são capazes de causar a mortalidade dos hospedeiros de forma semelhante à linhagem selvagem (FANG *ET AL.*, 2007). Portanto, conídios viáveis são essenciais para a infecção em ambientes naturais.

A próxima fase no processo de infecção de *Metarhizium* envolve a penetração, quando o fungo rompe a cutícula e atinge a hemocele e se diferencia em blastosporos. Nesta fase ocorre a secreção de hidrolases como quitinases e proteases, uma vez que a procutícula é rica em quitina embebida em uma matriz de proteínas, e a degradação destes componentes nutre a célula enquanto a infecção desenvolve-se (ST LEGER *ET AL.*, 1996a; ST LEGER *ET AL.*, 1996c; GILLESPIE *ET AL.*, 1998). A presunção dos substratos apresentados ao fungo direcionou muitos dos estudos buscando descrever a infecção de *Metarhizium* em níveis moleculares. Quitinases e proteases

secretadas pelo fungo em diferentes meios que mimetizam condições propícias à patogenia foram alguns dos primeiros alvos destes estudos. Várias enzimas extracelulares responsáveis por degradar a cutícula foram identificadas em fungos entomopatogênicos (ST LEGER *ET AL.*, 1987a; TIAGO *ET AL.*, 2002), e sua indução em meios contendo cutícula foi estudada.

Enzimas proteolíticas são detectadas em géis de atividade quando se utiliza sobrenadantes de meios mimetizando a infecção em aproximadamente 24 h de cultivo (ST LEGER *ET AL.*, 1987b; ST LEGER *ET AL.*, 1987c), sendo descritas em *Metarhizium* pelo menos 14 isoformas de diversas classes de proteases, com diferentes pIs (ST LEGER *ET AL.*, 1987b). As proteases do tipo subtilisina são as mais abundantes, com pelo menos 11 genes descritos (BAGGA *ET AL.*, 2004). Nosso grupo vem estudando proteases e construiu uma linhagem superexpressando uma protease do tipo subtilisina, PR1A, apresentou um aumento na patogenicidade contra lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis*. Entretanto, o mesmo não foi observado quando o hospedeiro desafiado foi o carrapato do gado *R. (Boophilus) microplus* (FRANCESCHINI 2005), sugerindo que, pelo menos em termos de proteases, diferentes hospedeiros têm diferentes suscetibilidades. Provavelmente essas diferentes proteases evoluíram de forma a tornar o fungo capaz de infectar vários hospedeiros diferentes, em termos da composição da sua cutícula. Outro trabalho relatou a não alteração da patogenicidade frente a estágios imaturos de *Galleria mellonella* de uma linhagem apresentado deleção espontânea de um cromossomo contendo o ortólogo do gene *pr1A* quando comparada à linhagem contendo tal cromossomo. Porém, na linhagem deletada, houve diminuição da virulência quando os hospedeiros foram larvas de *Tenebrio*

*molitor* (WANG *ET AL.*, 2002). Da mesma forma foi demonstrado que a superexpressão de PR1A provocou um aumento na virulência frente à lagarta *Manduca sexta* (ST LEGER *ET AL.*, 1996b).

De acordo com Leger e colaboradores (1996c), as proteases são sintetizadas e secretadas antes que as quitinases em uma escala temporal do processo de infecção. Este fato provavelmente se deve à estrutura da cutícula, onde as fibras de quitina servem de ancoradouro para a matriz protéica e, portanto, oclusa por ela, impedindo o acesso imediato das quitinases, fazendo com que o fungo tenha evoluído para secretar hidrolases de forma coordenada (ST LEGER *ET AL.*, 1996c; PEDRINI *ET AL.*, 2007). Porém, a malha de quitina constitui uma camada que deve ser transpassada para o sucesso da infecção e, portanto, as quitinases constituem-se em francos candidatos a hidrolases essenciais ao processo de infecção.

Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa mostram que a quitinase CHIT30, codificada pelo gene *chi3*, é altamente expressa por *Metarhizium* quando em processo de infecção do carrapato *R. (Boophilus) microplus* em ensaios de imunohistoquímica (DA SILVA *ET AL.*, 2005). Staats (2007) realizou a construção de um mutante nulo para o gene *chi3*, cuja patogenicidade foi reduzida contra o inseto manchador do algodão *D. peruvianus*, além de apresentar deficiência de crescimento em condições de estresse térmico. Contudo, a superexpressão de *chi3* não produziu mutantes viáveis. De fato, quitinases também são importantes para os processos morfológicos do fungo e a não expressão de uma determinada quitinase pode prejudicar a degradação e posterior re-síntese das fibras de quitina da extremidade distal das hifas, alterando o seu desenvolvimento. A

superexpressão pode acarretar um possível acúmulo de quitinase na região do Spitzenkörper e evitar a síntese de novas fibras da parede celular, impedindo o enrijecimento da célula e, conseqüentemente, causando o rompimento da célula devido à pressão osmótica do meio externo (STEINBERG 2007). Em contrapartida, a superexpressão de uma quitinase de 42 kDa, CHIT42, produziu mutantes viáveis, mas não alterou a virulência contra lagartas de *M. sexta* (SCREEN ET AL., 2001).

Tendo em vista a identificação de genes envolvidos em outras rotas importantes para a infecção, mas que não necessariamente codifiquem enzimas hidrolíticas, como proteínas de adesão e proteínas detoxificantes de ERO, estudos empregando análise de diferença representacional (*Representational Difference Analysis* – RDA) e análises de microarranjos de DNA abriram novas perspectivas no estudo deste processo (FREIMOSER ET AL., 2003; DUTRA ET AL., 2004; WANG ET AL., 2005b).

Freimoser e colaboradores (2003), utilizando bibliotecas de etiquetas de seqüências expressas (*Expressed Sequence Tags* – EST) obtidas em condições de infecção, identificaram uma série de proteínas secretadas que teriam função direta na disrupção da cutícula de hospedeiros, como proteases do tipo tripsina (*try1* e *try2*), proteases do tipo subtilisina (*pr1A* e *pr1J*) e quitinases (*chi1*, *chi2* e *chi3*), provavelmente envolvidas com a nutrição do fungo durante a infecção. Também foram identificados genes envolvidos com a modificação da parede celular, na morfogênese, e com a proteção de conídios contra defesas do hospedeiro, entre outros.

Dutra e colaboradores (2004), subtraindo cDNA sintetizado a partir de mRNA extraído de *Metarhizium* cultivado em condições de infecção contra cDNA sintetizado a partir de mRNA extraído a partir de cultivos contendo glicose, identificaram genes de proteínas envolvidas em metabolismo de compostos complexos de carboidratos ( $\alpha$ -1,3-exoglicanase), metabolismo energético (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), proteólise (PR1C subtilisina), proteína estrutural de membrana (PTH11), de resposta a estresse (flavo-hemoglobina e proteína de choque térmico), entre outros. Tal técnica permitiu avaliar, pela diferença de expressão gênica dentre as condições, genes com níveis de expressão mais elevados em condições de infecção.

A tecnologia de microarranjos de DNA (BROWN & BOTSTEIN 1999) possibilitou decifrar a programação transcricional de organismos estudando a expressão gênica global e, posteriormente, validando e estudando individualmente cada gene. Wang e colaboradores (2005b) utilizando microarranjos de DNA hibridizados com RNA obtido a partir de cultivos de *Metarhizium* contendo cutículas de lagartas de *M. sexta*, revelaram diversos genes envolvidos com a degradação de componentes da cutícula, como quitinases, proteases e glicanases, bem como genes envolvidos com resposta ao estresse, sinalização celular, entre outros.

Após a penetração através da cutícula, as hifas atingem a hemocele e inicia-se o processo de diferenciação a blastosporos. Estes são propágulos originados a partir do brotamento da extremidade distal da hifa, cuja forma esférica em comparação à hifa permite uma rápida disseminação pelo sistema circulatório do hospedeiro, o que leva à disseminação da infecção. Também

nesta fase, o gene *mad1*, que codifica adesinas, tem papel importante, pois os mutantes nulos para este gene não formam blastosporos, uma vez que foram observadas alterações na citocinese e desorganização do citoesqueleto (WANG & ST LEGER 2007b), constituindo-se em um gene essencial para que a patogênese ocorra.

Genes de resposta a espécies reativas de oxigênio (ERO) também são ativados durante o processo de infecção de *Metarhizium*. Isso se deve a dois fatores principais: (i) a produção de ERO constitui-se em uma das defesas dos hospedeiros contra a infecção de patógenos e (ii) pela alta taxa metabólica do fungo, uma vez que o conídio, antes em condições de metabolismo mínimo, passa a receber uma grande oferta de substrato e tem sua taxa metabólica aumentada, o que gera grandes quantidades de ERO. Portanto, supõe-se que o fungo necessite de um sistema de detoxificação destes ERO. Nosso grupo identificou e isolou seqüências de DNA de duas superóxido dismutases (SOD), sendo uma Manganês SOD (MnSOD) e outra Ferro SOD (FeSOD), e identificou a atividade destas enzimas em extratos de *M. anisopliae* por zimogramas. É provável que estas enzimas protejam as células de danos provocados por oxi-radicais produzidos pelos processos de infecção pelo aumento do metabolismo quando em contato com os nutrientes do hospedeiro (PINTO JR. 1994; PINTO JR. 1998). Genes de enzimas de detoxificação de ERO também foram identificados como diferencialmente expressos em ensaios de microarranjo de DNA contendo seqüências isoladas a partir de *Metarhizium* cultivado em presença da cutícula de hospedeiros (WANG ET AL., 2005b).

Nesta fase, ocorre a produção e a secreção de toxinas do tipo destruxinas, que são peptídeos cíclicos (hexadepsipeptídeos) originados no



metabolismo secundário, compostos por ácido  $\alpha$ -hidróxi e cinco resíduos de aminoácidos (PEDRAS *ET AL.*, 2002). Estas moléculas parecem ser importantes para que a imunidade inata do inseto seja debilitada (PAL *ET AL.*, 2007). Além disso, as destruxinas causam colapso do sistema muscular, bloqueiam a atuação dos hemócitos e túbulos de Malpighi (BIDOCHKA *ET AL.*, 1997; KERSHAW *ET AL.*, 1999). Essas atividades impedem que o hospedeiro alimente-se e diminuam a sua mobilidade.

Estudos mostram que insetos infectados tendem a mudar seu padrão comportamental, procurando locais com temperaturas mais elevadas, provocando uma “febre” comportamental que impediria a patogênese por inibir o desenvolvimento do patógeno em temperaturas mais elevadas (ELLIOT *ET AL.*, 2002). Portanto, a ação de destruxinas seria importante também para a manutenção das condições ideais de patogenia, impedindo este comportamento pela diminuição da mobilidade. De fato, linhagens que produzem destruxinas em maior quantidade tendem a ser mais virulentas (SREE *ET AL.*, 2008). A alimentação artificial contendo destruxinas causou a mortalidade de lagartas de *Spodoptera litura* (SREE *ET AL.*, 2008).

Ainda, considerando o sistema imune dos artrópodes como barreira a infecção, conídios e blastosporos de *Metarhizium* são recobertos por uma classe de colágeno, sintetizado pelo gene *Mcl1*, que ajuda na evasão do ataque por hemócitos. Mutantes nulos para *Mcl1* têm a patogenicidade diminuída quando comparada à linhagem selvagem (WANG & ST LEGER 2006). Considerando a hemocele, o silenciamento do gene *mos1*, um osmosensor responsável pela resistência de *M. anisopliae* a ambientes com grande osmolaridade como a hemolinfa, gerou linhagens com menor tolerância

a pressão osmótica, deficiência na síntese de parede celular, germinação alterada dos conídios e apressório defectivo (WANG *ET AL.*, 2008).

*Metarhizium* secreta grandes quantidades de trealase ácida na hemolinfa dos insetos, tratando-se, provavelmente, de uma adaptação do fungo em relação ao hospedeiro, uma vez que a trealose é o açúcar mais abundante (90%) na hemolinfa do inseto. Em condições *in vitro*, pode-se observar o desenvolvimento de *Metarhizium* em meios contendo trealose como única fonte de carbono e é provável que o fungo secrete trealase para que possa utilizar a trealose presente na hemolinfa do hospedeiro. A trealase tem a capacidade de clivar a trealose (formada por dois resíduos de  $\alpha$ -glicose) e disponibilizar glicose para a nutrição do fungo. A depleção da trealose na hemolinfa pode ser danosa ao inseto, uma vez que representa fonte energética e regula a pressão osmótica. Dessa forma, a secreção de trealase depletaria o sistema hemolinfático de trealose, liberando glicose, então utilizada como fonte nutricional para a célula fúngica em desenvolvimento. De fato, há a expressão aumentada do gene *ntl-1* de uma trealase, bem como há a detecção de trealase na hemolinfa de gafanhotos da espécie *Locusta migratória manilensis* quando infectados por *Metarhizium* (ZHAO *ET AL.*, 2006).

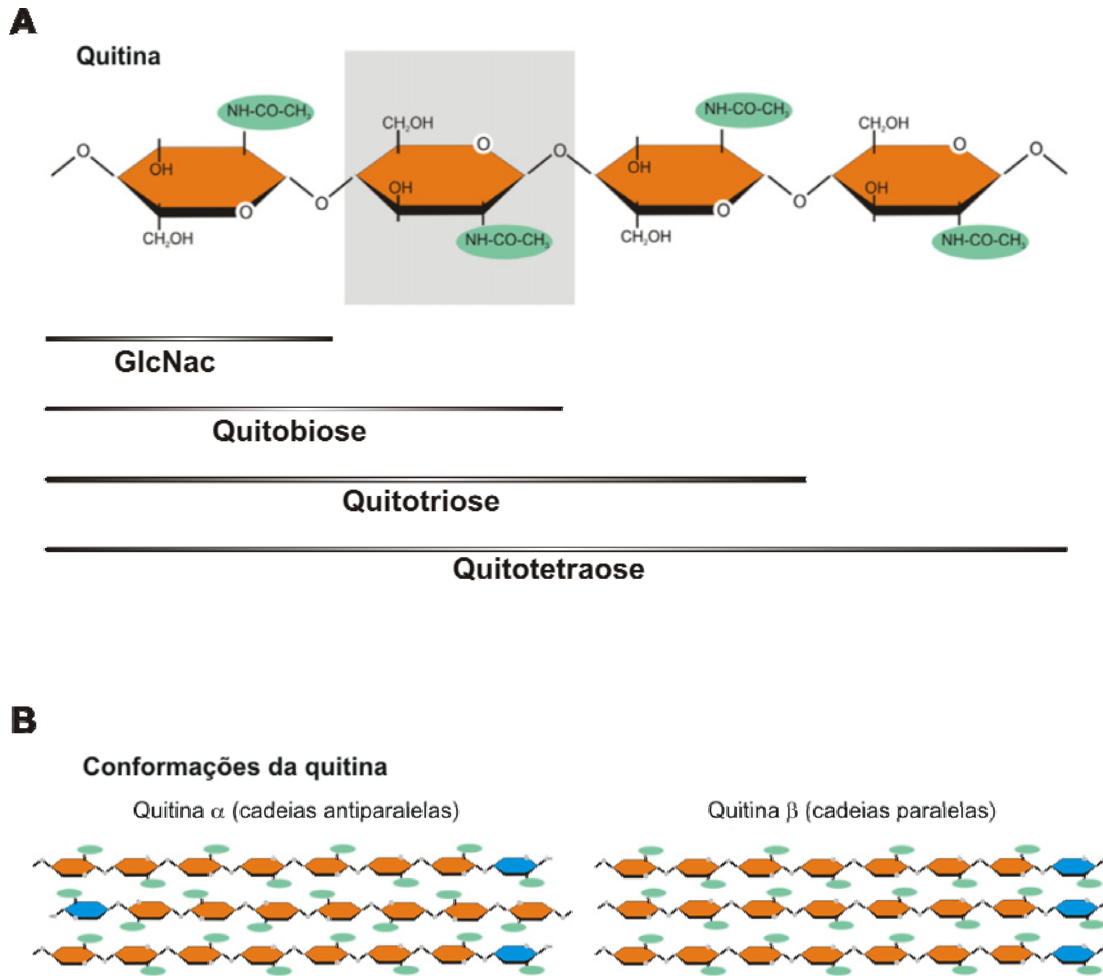
Quando os nutrientes do hospedeiro são exauridos, o fungo produz hifas a partir dos blastosporos e inicia-se o processo de extrusão de hifas, no sentido contrário ao da infecção. Nesta fase, a protease do tipo subtilisina PR1 é superexpressa e facilita a extrusão através da cutícula, permitindo a emersão do fungo (mumificação) e a produção de conídios na superfície do hospedeiro,

podendo manter-se na rizosfera ou infectar novos hospedeiros (SMALL & BIDOCHKA 2005).

### 2.3. Quitinases em fungos

A quitina faz parte da cutícula dos artrópodes e é uma barreira muito importante na defesa contra a infecção de vírus e bactérias. Está presente desde fungos até moluscos e artrópodes em geral, e confere rigidez às estruturas que compõe (CABIB 1987; BERNARD & LATGE 2001; ADAMS 2004). É o segundo polissacarídeo mais pervasivo na natureza, precedida somente pela celulose. A quitina é um homopolímero de subunidades *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (Fig. 2.3). Na natureza, duas maiores classes de quitina são encontradas, denominadas quitina  $\alpha$  e  $\beta$ , de acordo com o rearranjo antiparalelo ou paralelo das cadeias de GlcNAc, respectivamente (SEIDL 2008).

As quitinases são enzimas que degradam a quitina por hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4, liberando oligômeros, como a quitobiose, que posteriormente são degradados por acetilglicosaminidases a monômeros de GlcNAc. Estas moléculas podem ser utilizadas como fonte nutricional, quando, no interior da célula, são metabolizadas pelas quitinases, transformando-as em moléculas de *N*-acetil-D-glicosamina-6-fosfato. GlcNAc-6-P perde o radical acetil pela ação de deacetilases produzindo Glicosamina-6-P.



**Figura 2.3: Molécula de quitina. A.** Estrutura química da quitina. O quadrado cinza indica uma subunidade de *N*-acetil-D-glicosamina. **B.** Rearranjos das cadeias de quitina. Adaptado de SEIDL 2008.

A molécula Glicosamina-6-P é deaminada, formando Frutose-6-P, que pode entrar diretamente na via glicolítica (BISWAS *ET AL.*, 1979; SINGH & DATTA 1979a; SINGH & DATTA 1979c; SINGH & DATTA 1979b). A utilização de GlcNAc como única fonte de carbono e nitrogênio é tão efetiva quanto a de glicose em *Candida albicans*, uma vez que GlcNAc é altamente solúvel e é rapidamente incorporada pela célula (BHATTACHARYA *ET AL.*, 1974a; BHATTACHARYA *ET AL.*, 1974b). Monômeros de GlcNAc também podem ser

utilizados diretamente na formação de fibras de quitina no caso dos fungos (SINGH & DATTA 1979a).

As quitinases ocorrem em uma ampla gama de organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas, animais e humanos (DUO-CHUAN 2006; BHATTACHARYA *ET AL.*, 2007; YANG *ET AL.*, 2007). Seu papel em cada organismo é peculiar. No caso dos fungos, acredita-se que estas enzimas tenham papel na autólise, na nutrição e na morfogênese, além de poderem fazer parte dos processos de infecção em fungos entomo e micopatogênicos (ADAMS 2004; DUO-CHUAN 2006).

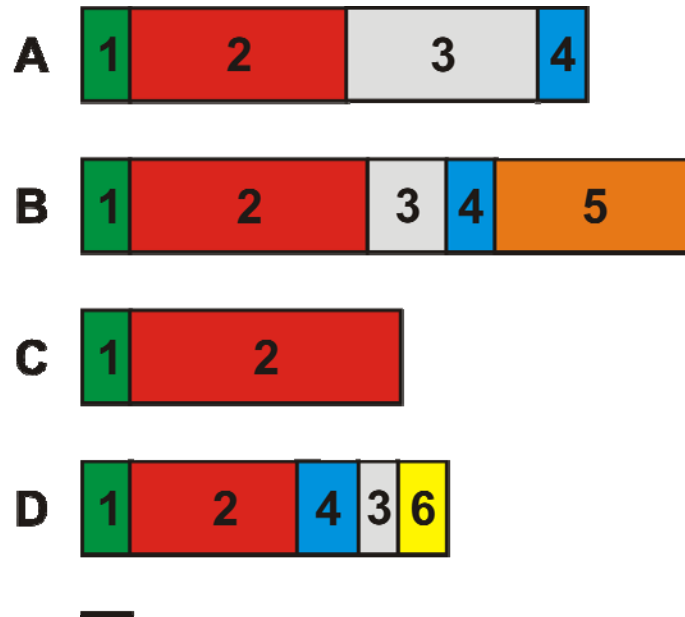
As quitinases podem ser classificadas em duas classes de acordo com a posição do ataque hidrolítico à quitina: endoquitinases (EC 3.2.1.14), que clivam a molécula aleatoriamente nos sítios internos gerando múltiplos solúveis de GlcNAc, como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose; e exoquitinases, que ainda são divididas em quitobiosidades (EC 3.2.1.29), que catalisam a liberação gradual apenas de diacetilquitobiose a partir da extremidade não redutora das cadeias de quitina, e  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.30), que liberam monômeros de GlcNAc a partir de diacetilquitobiose ou de polímeros maiores, como quitotriose e quitotetraose (DUO-CHUAN 2006).

Dentro do subgrupo Fungi, as quitinases estão amplamente distribuídas e desempenham diversas funções. São classificadas como glicosil hidrolases e, de acordo com este sistema de classificação baseado na similaridade da seqüência de aminoácidos presentes nos domínios catalíticos, as quitinases foram distribuídas em três famílias: 18, 19 e 20 (HENRISSAT 1999). A família

18 engloba as quitinases encontradas em bactérias, fungos, leveduras, vírus, plantas e animais, sendo a mais variada em termos evolutivos. A família 19 ocorre quase exclusivamente em plantas. As quitinases destas duas famílias não apresentam similaridade de aminoácidos entre si e têm estruturas tridimensionais e mecanismos moleculares de ação completamente distintos, sugerindo um ancestral comum diferente. A família 20 é constituída por  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidases de bactérias, fungos e humanos (DUO-CHUAN 2006). Porém, a presença da família 20 em fungos ainda é controversa (SEIDL 2008).

As quitinases de fungos pertencem à família 18 dentro da superfamília de glicosil hidrolases (SEIDL 2008). Uma de suas características é a sua estrutura multi-domínios. Tipicamente, cinco domínios compõem as quitinases classificadas dentro desta família. A Fig. 2.4 mostra esquematicamente estes domínios: (i) a região N-terminal contendo peptídeo sinal (verde); (ii) o domínio catalítico (vermelho); (iii) a região rica em serina/treonina (cinza); (iv) a região de ligação à quitina (azul); (v) a região C-terminal extensa (laranja) e (vi) região de ligação à celulose (amarelo) (KURANDA & ROBBINS 1991).

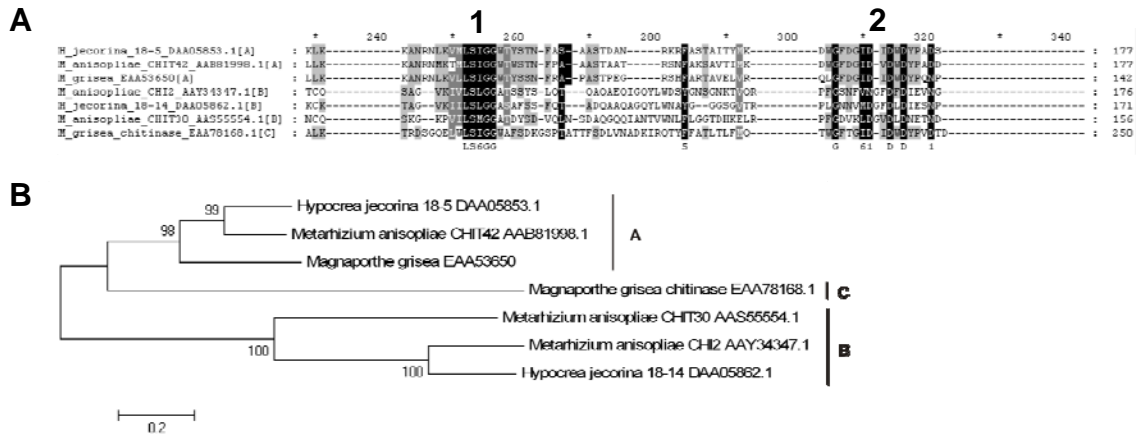
Um peptídeo sinal precede a região N-terminal da quitinase madura. Presumidamente, este peptídeo sinal medeia a secreção de enzimas e é clivada por sinal-peptidases tão logo a enzima é transportada através da membrana. Quitinases sem peptídeo sinal são caracteristicamente intracelulares e participam de eventos de morfogênese (TAKAYA *ET AL.*, 1998b; SEIDL *ET AL.*, 2005).



**Figura 2.4: Estrutura da família 18 de quitinasas fúngicas.** **A.** endoquitinase de *Saccharomyces cerevisiae* (CTS1); **B.** quitinase de *Rhizopus oligosporus* (CHI1); **C.** quitinase de *T. harzianum* (CHIT33); **D.** endoquitinase de *M. anisopliae* (CHI2). 1 – região do peptídeo sinal (verde); 2 – domínio catalítico (vermelho); 3 – região rica em serina/treonina (cinza); 4 – região de ligação à quitina (azul); 5 – C-terminal extenso (laranja); 6 – região de ligação à celulose (amarelo). Barra representa 40 resíduos de aminoácidos. Adaptado de DUO-CHUAN 2006 (CTS1, CHI1 e CHIT33) e BARATTO, BOLDO ET AL. 2006 (CHI2).

O sítio catalítico das quitinasas fúngicas, responsáveis pela hidrólise do substrato, compreende cerca da metade da região N-terminal da enzima. Alinhamentos de seqüências de quitinasas da família 18 revelam duas regiões altamente conservadas dentro da região catalítica, SxGG e DxxDxD(E) (Fig. 2.5), correspondendo à região de ligação ao substrato (ChBD) e ao domínio catalítico, respectivamente. Há, ainda, em algumas quitinasas, regiões ricas em serina/treonina e regiões de ligações a quitina, muito semelhantes a regiões de

ligação à celulose, além daquela localizada na região N-terminal (DUO-CHUAN 2006).



**Fig. 2.5: Filogenia de alguns representantes de quitinases fúngicas. A.** Alinhamento da região catalítica. (1) Consenso SxGG; (2) Consenso DxxDxD(E). **B.** Separação das quitinases analisadas nos subgrupos A, B e C. Valor de *Bootstrap*: 10.000.

A região rica em serina/treonina é normalmente glicosilada pós-traducionalmente para gerar a proteína madura. A glicosilação seria necessária para a secreção e manutenção da estabilidade. Acredita-se que algumas quitinases fiquem ancoradas na parede celular por esta região de ligação à quitina distante do centro catalítico ou que o substrato, quando ligado a esta região, faz com que a enzima mude sua conformação e conduza o substrato à outra região de ligação, ficando livre para receber uma nova molécula (KURANDA & ROBBINS 1991). Estas regiões secundárias de ligação à quitina são altamente similares a regiões de ligação à celulose (CBD) devido à presença de aminoácidos aromáticos. Também há relatos de uma quitinase de

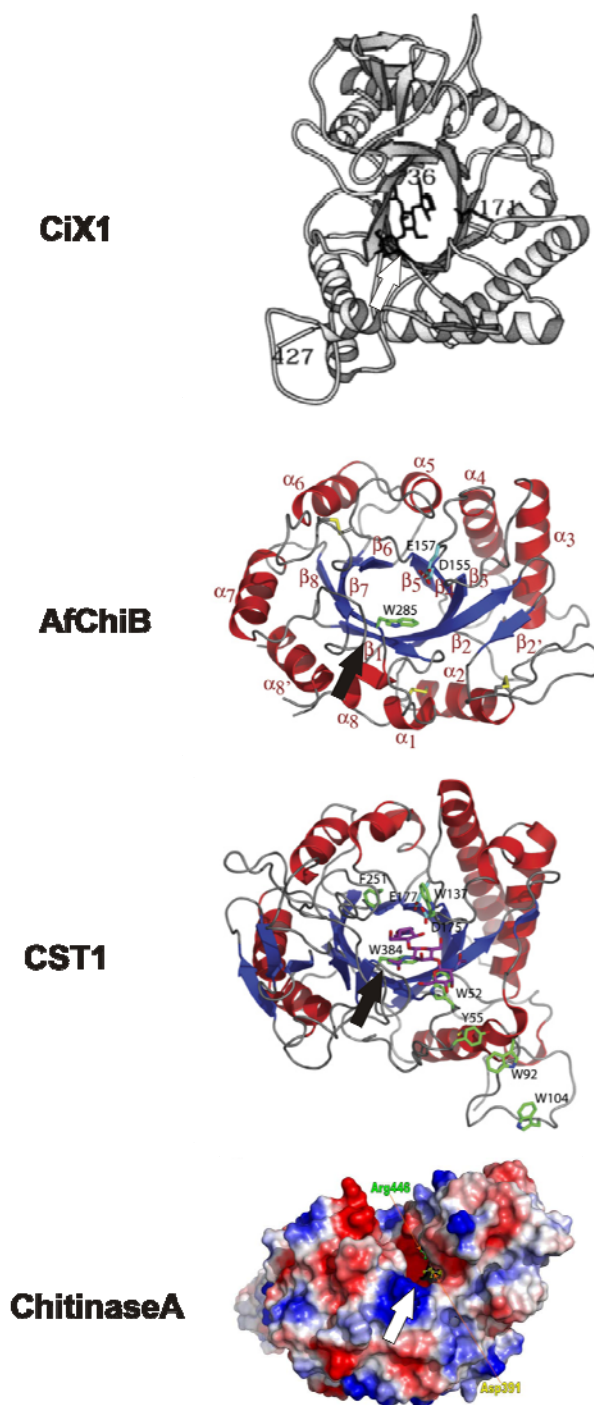


*Aspergillus nidulans* (ChiA), pertencente à família 18, que ficaria ancorada ao GPI nas extremidades de crescimento polarizado (YAMAZAKI *ET AL.*, 2008). Contudo, há quitinases que não possuem região de ligação à quitina, mas possuem condições de clivar moléculas de quitina (DUO-CHUAN 2006). Porém, ensaios adicionando sítios de ligação à quitina a estas quitinases aumentaram sua capacidade de ligação e clivagem de quitina (LIMON *ET AL.*, 2001).

Até o presente, apenas a estrutura cristalográfica de quatro quitinases de fungos estão disponíveis. Foram relatadas as estruturas tridimensionais da quitinase CiX1 de *Coccidioides immitis* (HOLLIS *ET AL.*, 2000), ChiB1 de *A. fumigatus* (RAO *ET AL.*, 2005), ScCTS1 de *S. cerevisiae* (HURTADO-GUERRERO & VAN AALTEN 2007) e ChitinaseA de *Serratia marcescens* (ZEES *ET AL.*, 2009). O sítio ativo de CiX1 é conservado e o resíduo E171 é, provavelmente, o resíduo catalítico, uma vez que mutagênese sítio dirigida de E171 eliminou qualquer atividade de quitinase. A estrutura tridimensional das quitinases fúngicas consiste em forma de barril com oito  $\alpha$ -hélices e oito folhas  $\beta$ -pregueadas em paralelo, formando o centro do barril, em alternância (Fig. 2.6). A estrutura possui um canal, ou cavidade, considerado o sítio ativo, o qual liga unidades de quitina, que é, então, clivada (DROUILLARD *ET AL.*, 1997).

Com base na estrutura e na seqüência de aminoácidos, as quitinases são, ainda, divididas em diferentes subfamílias, classes ou grupos. Enquanto as quitinases bacterianas e vegetais têm diferenças marcantes entre si, elas são claramente divididas em distintas classes, ao passo que quitinases de fungos têm sua divisão contraditória. Dentro da família 18, duas classes

distintas podem ser identificadas de acordo com a sua similaridade entre quitinases de plantas ou bacterianas. Estas classes são chamadas classes fúngica/bacteriana (classe V) ou fúngica/vegetal (classe III) (DUO-CHUAN 2006). Recentemente, de acordo com análises filogenéticas, foi sugerido que as quitinases da família 18 podem ser subdividas em três grupos: grupos A e B (correspondentes às classes V e III de quitinases vegetais, respectivamente), e um novo grupo, C.



**Figura 2.6: Cristalografia de quitinasases de fungos da família 18.** Quitinasases **CiX1** de *C. immitis*; **AfChiB** de *A. fumigatus*; **CST1** de *S. cerevisiae* e **ChitinaseA** de *S. marcescens*. Modificado de HOLLIS (2000); RAO (2005); HURTADO & VAN-AALTEN (2007) e ZEES (2009). Setas evidenciam a cavidade que compõe o centro catalítico.

As quitinases pertencentes ao subgrupo A (antiga classe V) contêm o domínio catalítico de quitina, mas não possui domínio de ligação a carboidratos, incluindo a quitina, e possuem massa molecular que varia entre 40 e 50 kDa. A maioria destas quitinases possui peptídeo-sinal de exportação na região amino-terminal, com algumas exceções cuja localização é intracelular. Credita-se a este subgrupo a função de morfogênese, sem envolvimento com a aquisição de nutrientes pela degradação de quitinase exógena. Quitinases do subgrupo B (antiga classe III) também possuem peptídeo-sinal de exportação na região amino-terminal e variam grandemente em massa molecular, com representantes de 30 a 90 kDa. Quitinases de menor massa deste subgrupo possuem domínio de ligação à celulose, o qual possui um espectro maior de ligação e pode ligar outros polissacarídeos, como a quitina. Quitinases com maior massa também pertencentes a este subgrupo normalmente possuem domínios ricos em serina e treonina e/ou sinal de ancoramento por GPI, de forma que quitinases maduras ficariam ligadas à membrana ou parede celulares. O subgrupo B seria o responsável pela degradação da quitina exógena a fim de suprir requerimentos nutricionais ao fungo. O subgrupo C de quitinases é o mais recentemente descrito e não possui função definida. É o subgrupo com os representantes de maior massa, variando entre 140 e 170 kDa. Possuem peptídeo-sinal em sua região amino-terminal e outras características não encontradas em outros subgrupos de quitinases, como domínios de ligação a peptídeoglicana que também pode ser ligada à quitina (SEIDL 2005; SEIDL 2008; KARLSSON & STENLID 2008).

Considerando a fisiologia dos fungos, alguns genes de quitinases de leveduras foram estudados. Em *S. cerevisiae*, durante o brotamento, o septo é

depositado entre as células embebido em um anel de quitina. A degradação desse material leva à separação celular e envolve uma endoquitinase altamente glicosilada. A disrupção do gene desta endoquitinase, *cts1*, resulta em células densas e que não se separam após a divisão, assim como ocorre em *Candida albicans* após a deleção do gene *chi2* (KURANDA & ROBBINS 1991; MCCREATH *ET AL.*, 1995). O trabalho com *S. cerevisiae* foi o primeiro a elucidar o papel de uma hidrolase de parede celular no crescimento fúngico. A disrupção do gene *cts2* também provocou severas modificações morfológicas, impedindo a biossíntese regular da parede celular de esporos e a formação de ascos maduros (GIAEVER *ET AL.*, 2002). A levedura *K. lactis* secreta uma toxina que possui atividade semelhante à das quitinases, envolvida na defesa contra leveduras competitivas (BUTLER *ET AL.*, 1991).

Em fungos filamentosos, quitinases podem ter papel durante a esporulação, germinação de esporos, crescimento e autólise de hifas. Há relatos de que o gene da quitinase *chi3* de *Rhizopus oligosporus* é transcrito durante o crescimento das hifas e sua seqüência predita de aminoácidos não indica a existência de peptídeo sinal, sugerindo que a função da quitinase codificada pelo gene *chi3* seria quebrar as cadeias de quitina da parede celular na ponta da hifa, desestruturando-a e permitindo que a pressão de turgor alongue a hifa em seu ápice (TAKAYA *ET AL.*, 1998a). Outro trabalho demonstra que a disrupção do gene que codifica a quitinase ChiA de *A. nidulans* causa a queda na freqüência da germinação de esporos e diminuição do crescimento de hifas (TAKAYA *ET AL.*, 1998b). Ainda, a disrupção do gene *nagA*, também de *A. nidulans*, impede seu crescimento em meio contendo quitobiase como única fonte de carbono, mas nenhuma alteração fenotípica é

detectada em meio contendo glicose. Estes dados sugerem que NagA não é essencial para o fungo crescido em meio contendo fontes de carbono facilmente metabolizadas, mas sim para assimilar fontes de carbono a partir da degradação da quitina (KIM *ET AL.*, 2002). Ainda, há casos em que a disrupção de genes de quitinases não influenciaram ou modificaram a morfogênese de alguns fungos (REICHARD *ET AL.*, 2000; JAQUES *ET AL.*, 2003; MAMARABADI *ET AL.*, 2008). A razão provável para este fato é que isoenzimas possam assumir o papel das enzimas ausentes ou que estas enzimas, por serem secretadas, não tenham papel na morfogênese, atuando na aquisição de fontes energéticas exógenas a partir da degradação de quitina externa à célula (JAQUES *ET AL.*, 2003; ADAMS 2004).

O papel das quitinases no micoparasitismo e na patogênese de artrópodes também tem sido investigado. Acredita-se que quitinases tenham um papel importante no processo de micoparasitismo de *T. harzianum*, especialmente na penetração através da parede celular e utilização de nutrientes degradando a parede celular dos fungos parasitados (INBAR & CHET 1995). Recentes trabalhos demonstram que genes de quitinases (como *ech42*, *chi33*, *nag1* e *chi18-13*) de *T. harzianum* têm um papel importante no micoparasitismo, especialmente o gene *ech42*, cuja disrupção afetou diretamente a infecção (ZEILINGER *ET AL.*, 1999; SEIDL *ET AL.*, 2005). Quitinases também têm papel em fungos entomopatogênicos. A superexpressão do gene de uma quitinase *Bbchit1* do entomopatógeno *Beauveria bassiana* aumentou a virulência do fungo frente a *Myzus persicae*, um afídeo, em 50% comparado aos valores da linhagem selvagem. Isto demonstra que a superexpressão de *Bbchit1* aumentou a eficácia de *B.*

*bassiana* em causar mortalidade em afídeos, sem alterações morfológicas das estruturas do fungo (FANG ET AL., 2005). A quitinase codificada por este gene não possui sítio de ligação à quitina. Em um trabalho realizado por Fan e colaboradores (2007), foi adicionado a esta quitinase um domínio de ligação à quitina (CBD), fato que aumentou em 23% a virulência do fungo transformante em comparação à linhagem selvagem.

Em *Metarhizium*, trabalhos para determinar o possível papel das quitinases foram realizados. O início dos estudos de quitinases de *Metarhizium* ocorreu em 1987, quando St Leger e colaboradores analisaram sobrenadantes de cultura de *Metarhizium* mimetizando condições de infecção e atividade quitinolítica foi detectada. O mesmo grupo, em 1991, cultivou *Metarhizium* em meios contendo apenas quitina cristalina como fonte de carbono e duas quitinases foram purificadas: uma com atividade de endoquitinase e outra de quitobiase (ST LEGER ET AL., 1991). Ainda, em trabalhos realizados por St. Leger e colaboradores (1996a), zimogramas de quitinases demonstraram a presença de diversas isoformas de quitinases, sendo a mais expressa uma quitinase de 43,5 kDa, com identidade a uma quitinase de 42 kDa de *T. harzianum*, cuja secreção revelou ser mais tardia em relação à secreção de proteases.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo das quitinases de *Metarhizium* e o primeiro gene a ser isolado foi o da quitinase de 42 kDa, previamente detectada por St. Leger e colaboradores, denominado *chit1*. Este gene apresenta uma fase aberta de leitura (Open ReadinG Frame – ORF) de 1.521 pb e três íntrons. Codifica para uma proteína de 423 aminoácidos (sendo que os 35 primeiros constituem a seqüência de peptídeo-sinal) e que, madura,

possui 42 kDa e PI de 5,8 (BOGO *ET AL.*, 1998). Este gene foi clonado em plasmídeos de expressão em *Escherichia coli* e análises revelaram tratar-se de uma endoquitinase (BARATTO *ET AL.*, 2003). Contudo, a superexpressão em *Metarhizium* do gene *chit1*, apesar de ter aumentado os níveis de atividade quitinolítica extracelular consideravelmente, não provocou aumento da virulência frente a lagartas de *Manduca sexta* (SCREEN *ET AL.*, 2001).

O gene *chi2*, que é alvo de estudo deste trabalho, foi clonado e caracterizado previamente. Contém uma ORF de 1.542 pares de base, interrompida por dois íntrons, de 211 e 72 pares de base e que codifica para uma quitinase de 42 kDa e PI predito de 4,8. Sua expressão é regulada por diferentes fontes de carbono, sendo mais expressa em meios contendo quitina cristalina, GlcNAc em baixas concentrações e cutículas do carrapato *R. (Boophilus) microplus* e reprimida em meios contendo glicose (BARATTO *ET AL.*, 2006).

Uma terceira quitinase, CHIT30, foi purificada por nosso grupo e foi a primeira quitinase a apresentar tanto atividade de *endo* quanto de *exo*quitinase. Parte do cDNA correspondente ao gene foi isolado a partir de bibliotecas de expressão e os mesmos anticorpos foram utilizados em ensaios de *Western blot*. Estes experimentos mostraram que esta quitinase possui expressão diferencial de acordo com o tipo de fonte de carbono disponibilizada, sendo mais expressa em meios contendo quitina cristalina, GlcNAc em baixas concentrações e cutícula do carrapato *R. (Boophilus) microplus* e reprimida em meios contendo glicose (DA SILVA *ET AL.*, 2005). Mutantes nulos para esta quitinase foram construídos, sem nenhuma alteração morfológica aparente,



mas tiveram sua virulência e tolerância a altas temperaturas diminuídas (STAATS 2007).

#### 2.4. Regulação das quitinases

As quitinases produzidas por fungos podem ser induzidas ou reprimidas dependendo das condições fisiológicas em que o fungo se encontra. Em geral, quando são cultivados em meio contendo quitina, a atividade de quitinases é detectada, demonstrando a síntese de quitinases possivelmente responsáveis pela patogenia e pela nutrição do fungo (MORAES *ET AL.*, 2003; BARRETO *ET AL.*, 2004; LI & ROSEMAN 2004; DA SILVA *ET AL.*, 2005). Porém, a grande diversidade destas enzimas denota um sistema de regulação mais complexo. Até o momento, as quitinases estudadas são reguladas por um sistema repressor/indutor, no qual a quitina e outros produtos da degradação (como o monômero GlcNAc em baixas concentrações) atuam como indutores enquanto glicose ou outras fontes de carbono facilmente assimiláveis atuam como repressores (MORAES *ET AL.*, 2003). Estudos extensivos caracterizaram os padrões de expressão de quitinases em diferentes meios de cultivo. Estes trabalhos demonstraram que cultivos contendo fontes de carbono complexas, como quitina cristalina ou carapaça de *R. (Boophilus) microplus*, os níveis de quitinases tendem a ser mais altos em que aqueles onde há a presença de glicose como única fonte de carbono. Estes meios de cultivo foram utilizados pois são meios que mimetizam as condições de infecção. Portanto, *Metarhizium* teria níveis maiores de expressão de quitinases em condições de infecção. Outro meio onde foi observado o aumento na expressão de quitinases foi o meio de cultivo contendo baixas concentrações de GlcNAc. Por

outro lado, situações onde há a presença de fontes de carbono facilmente assimiláveis, como glicose, o sistema é reprimido, assim como por GlcNAc em altas concentrações.

A depleção de fontes de carbono também induz o sistema, provavelmente numa tentativa de degradar quitina de fonte exógena, assim como ocorre com outros fatores de estresse, como baixas e altas temperaturas e alta pressão osmótica (MACH *ET AL.*, 1999; STAATS 2007). Suportes sólidos mimetizando a superfície de contato do esporo com o hospedeiro induzem, em *M. anisopliae*, a formação de apressório, uma modificação morfológica essencial neste fungo para a infecção. É provável que haja a síntese de quitinases para remodelamento da parede do fungo. Isto significa que sinais externos além da presença dos substratos da enzima possivelmente induzam quitinases envolvidas nos processos de morfogênese.

Esse modelo de regulação é mais geral e ocorre em muitos fungos. Em *T. harzianum*, por exemplo, a presença de elementos de resposta ao estresse no promotor de quitinases foi identificada (BRUNNER *ET AL.*, 2003). Contudo, apesar de serem reguladas dependendo da fonte de carbono disponível, níveis constitutivos baixos de expressão de quitinases são detectados mesmo em cultivos contendo glicose. Provavelmente, a secreção de quitinases e de N-acetilglicosaminidases em baixas concentrações daria início à degradação da quitina e, quando houvesse a liberação de GlcNAc, o sistema de quitinases seria induzido, pois isso indicaria a presença do substrato (INBAR & CHET 1995).

Como esperado, devido à diversidade de quitinases contidas no genoma dos fungos, existem outros mecanismos de regulação, como a regulação pós-transcricional, onde quitinases de *T. harzianum* apresentam duas espécies de transcritos (uma totalmente processada e outra que não sofre processo de *splicing*) e suas quantidades relativas dependem das condições de cultivo (SEIDL *ET AL.*, 2005). Este evento também já foi descrito em *Magnaporthe grisea* (EBBOLE *ET AL.*, 2004).

Em condições de parasitismo, como ocorre em *T. harzianum*, algumas quitinases são mais expressas durante a infecção dos hospedeiros *Sclerotium rolfsii* (INBAR & CHET 1995), *Rhizoctonia solani* (CARSOLIO *ET AL.*, 1994) e *Botrytis cinerea* (LORITO *ET AL.*, 1998). As quitinases, nestas condições, seriam ativadas após o contato de *T. harzianum* e *R. solani*, logo que haja a interação e o reconhecimento da superfície do hospedeiro (CARSOLIO *ET AL.*, 1994).

Em *M. anisopliae*, as quitinases, tanto secretadas quanto as intracelulares, tem comportamento semelhante àquelas de *T. harzianum*, sendo induzidas, em condições que mimetizam a infecção *in vitro*, por quitina cristalina, cutículas de artrópodes hospedeiros diversos, e GlcNAc em baixas concentrações (0,5%) e são reprimidas em meios contendo glicose e altas concentrações de GlcNAc (MORAES *ET AL.*, 2003; BARRETO *ET AL.*, 2004). Além disso, o gene *chi3* tem sua expressão aumentada em condições de choque térmico, assim como a atividade de *endo* e *exo*quitinases, fato que demonstra que esta quitinase pode ter papel em condições fisiologias adversas (STAATS 2007). Além disso, a quitinase codificada pelo gene *chi2* apresenta duas formas de transcritos em análises de RT-PCR e *Northern blot*, podendo

representar eventos de controle da expressão por *splicing* alterado ou retenção de íntrons (este trabalho).

## 2.5. Processamento diferencial de transcritos em fungos filamentosos

De forma geral, genes de eucariotos são interrompidos por íntrons que são, geralmente, removidos por um processo denominado *splicing*, para gerar moléculas maduras funcionais de mRNA. Este processo é conservado em Arqueobactérias e desde leveduras até humanos e envolve o reconhecimento de seqüências específicas contidas tanto nos éxons quanto nos íntrons. Contudo, a presença de tais sítios de *splicing* não necessariamente implica na sua remoção pela maquinaria de *splicing*. A verificação da não remoção de todos os íntrons de um determinado gene levou à descoberta de um mecanismo importante de controle da expressão gênica denominado *splicing* alternativo. Por este mecanismo, um determinado gene pode produzir proteínas diferentes, com funções distintas (SCHELLENBERG *ET AL.*, 2008).

Diferentemente de eucariotos superiores, os genes de fungos possuem éxons mais longos e íntrons mais curtos, mas mantém conservados os sítios de reconhecimento de *splicing*. Assim como em outros eucariotos, o evento de *splicing* alternativo também ocorre em fungos (KUPFER *ET AL.*, 2004) (Tabela 2).

O gene *MATa1* de *S. cerevisiae* sofre *splicing* alternativo no íntron localizado na porção 3' do mRNA e esta espécie de transcrito tende a acumular-se na célula. Ensaio de mutagênese induzindo o *splicing* deste

íntron demonstraram a incapacidade de células diplóides esporular em condições de falta de nutrientes. A proteína codificada a partir desta espécie de transcrito seria fundamental para o processo de esporulação (NER & SMITH 1989). Genes presentes em transposons também sofrem *splicing* alternativo, como em *Tolypocladium inflatum* (KEMPKEN & KUCK 1996) e em *Yarrowia lipolytica* (NEUVEGLISE ET AL., 2005), porém a síntese de proteínas a partir dos transcritos alternativos não foi demonstrada. Contudo, análises de bioinformática demonstraram que a provável proteína oriunda do processamento alternativo teria maior grau de homologia com outras proteínas de transposons de fungos em ambos os casos (KEMPKEN & KUCK 1996; NEUVEGLISE ET AL., 2005).

Tabela 2. Exemplos de genes que sofrem *splicing* alternativo em fungos.

Organismo	Gene	Relação nº Éxons:Íntrons	Evento	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	<i>g1</i>	2:1	1º íntron retido	BOEL ET AL., 1984
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa1</i>	3:2	2º íntron retido	NER & SMITH 1989
<i>Neurospora crassa</i>	<i>cpc-1</i>	3:2	1º íntron retido	EBBOLE ET AL., 1991
<i>Tolypocladium inflatum</i>	<i>restless</i> (transposon)	2:1	1º íntron retido	KEMPKEN & KUCK 1996
<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>nadp-gdh</i>	23:22	áuxon * diversos íntrons	MILLER ET AL., 1998
<i>S. cerevisiae</i>	<i>YKL186C/MTR2</i>	12:11	diversos	DAVIS ET AL., 2000
<i>S. cerevisiae</i>	<i>YML034W</i>	13:12	diversos	DAVIS ET AL., 2000
<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>impdh</i>	5:4	(1) 1º íntron retido (2) 1º e 3º íntrons retidos	YE ET AL., 2001
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	<i>crt1</i>	12:11	1º íntron retido	LODATO ET AL., 2003
<i>X. dendrorhous</i>	<i>crtYB</i>	5:4	1º íntron e fragmento do 2º éxon retido	LODATO ET AL., 2003
<i>Mucor circinelloides</i>	<i>rce1</i>	4:3	(1) perda do éxon 2 (2) 2º íntron retido	BABA ET AL., 2005
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>muty-1</i> (transposon)	3:2	2º íntron retido	NEUVEGLIS E ET AL., 2005
<i>N. crassa</i>	<i>tob55</i>	4:3	(1) 3º íntron retido (2) 2º e 3º íntrons retidos (3) 3º íntron e fragmento do 2º éxon retidos	HOPPINS ET AL., 2007
<i>N. crassa</i>	<i>hex-1</i>	3:2	2º íntron retido	LEAL ET AL., 2009

\* áuxon – fragmento de DNA que ora comporta-se como éxon, sendo mantido no mRNA maduro, ora como íntron, sendo removido.

Também regulado por sinais ambientais, o gene *impdh* de *Pneumocystis carinii* sintetiza diferentes transcritos. Ensaios de RT-PCR demonstraram que o transcrito mais abundante retém os íntrons 1 e 3 quando o fungo foi isolado de pulmões de camundongos infectados, ao passo que o transcrito totalmente processado é mais abundante em meios artificiais (YE ET AL., 2001). O gene *g1* de *S. cerevisiae* também sofre *splicing* alternativo dependendo da fonte nutricional (BOEL ET AL., 1984), assim como o gene *hex-1*, de *N. crassa*, cujo *splicing* é modulado conforme as alterações de pl e pH do meio de cultivo (LEAL ET AL., 2009). Outra forma aparente de regulação do *splicing* alternativo é o envelhecimento do cultivo, como demonstrado nos genes *crt1* e *crtYB* em *X. dendrorhous*. Com o tempo de cultivo, as formas alternativas de transcritos tendem a terem seus níveis de expressão aumentados (LODATO ET AL., 2003). As etapas de desenvolvimento do fungo também podem ser importantes para esta regulação, uma vez que a relação entre transcritos alternativos e transcritos completamente processados do gene *cpc-1* de *N. crassa* tendem a diminuir nas células durante a germinação de conídios até a fase exponencial de desenvolvimento (EBBOLE ET AL., 1991). Já os genes *YKL186C/MTR2* e *YML034W* de *S. cerevisiae* sofrem *splicing* alternativo de acordo com a fase da meiose em que a célula se encontra (DAVIS ET AL., 2000). A presença de diferentes inibidores também pode alterar o padrão de *splicing* alternativo, como ocorre com o gene *tob55* em *N. crassa* (HOPPINS ET AL., 2007).

Além do *splicing* alternativo, outro mecanismo descrito para a geração de diferentes transcritos a partir de um mesmo gene foi denominado *splicing* alterado, tendo sido proposto por Larrondo e colaboradores (2004). A principal diferença entre ambos os processos é a formação ou não de distintas proteínas

funcionais. A análise de genes que sofrem *splicing* alternativo demonstra a presença de um códon de parada único para todas as formas. Isto significa que as diferentes variantes apresentam diferenças nas massas moleculares, nos pIs, nas estruturas e nos centros catalíticos, mas mantém sempre o último éxon, contendo o códon de parada. Genes que sofrem *splicing* alterado apresentam códons de parada prematuros em fase na seqüência dos íntrons retidos. Este fato indica que as proteínas produzidas a partir destes transcritos seriam truncadas e funcionalmente inativas, dependendo da posição do códon de parada. Quanto mais próximo o íntron estiver da região 3' do gene, maior a probabilidade das proteínas serem funcionais (LARRONDO *ET AL.*, 2004). A presença de fases abertas de leitura na região à montante do início do sítio de transcrição (*upstream Open Reading Frame* – uORF) foi encontrada na maioria dos genes que sofrem *splicing* alterado. Estas uORFs, geralmente, servem de início de transcrição e originam transcritos maiores que os usuais (DE LAS MERCEDES DANA & PINTOR-TORO 2005). Este fato pode ser essencial a este processo, uma vez que a transcrição afeta o processo de *splicing* de acordo com a sua interação com o promotor (KORNBLIHTT 2005).

O número de íntrons por gene varia nos eucariotos. Em um trabalho com alguns representantes de eucariotos, foi demonstrado que um tipo de *splicing* alterado, onde ocorre a retenção de íntrons, é predominante entre os fungos e os protistas, enquanto que a formação de cassetes de éxons é um tipo comum de *splicing* alterado em animais multicelulares. Em plantas, há uma proporção intermediária entre esses dois tipos de *splicing*. Este trabalho também mostrou que o tamanho dos íntrons pode ter correlação direta com a incidência de formação de cassetes de éxons, pois plantas e animais possuem íntrons



relativamente longos (maiores que 200 pb) quando comparados com fungos e protistas (abaixo de 180 pb) (MCGUIRE *ET AL.*, 2008). Existem muitos genes de fungos que, comprovadamente, sofrem *splicing* alterado (Tabela 3).

O *splicing* alterado do gene *cbhl* de *P. chrysosporium* não parece ser regulado, e as diferentes formas de transcritos estão presentes em níveis semelhantes ao longo do desenvolvimento do fungo (SIMS *ET AL.*, 1994). Os transcritos do gene *cbhII*, por outro lado, têm seu *splicing* alterado estritamente regulado pelo substrato e análises mais detalhadas dos íntrons revelam que nenhum deles possui *stop* códons em fase, o que daria origem a proteínas regiões C-terminais completamente distintas, aumentando a região de ligação ao substrato, apesar de distanciar esta região do centro catalítico (TEMPELAARS *ET AL.*, 1994; BIRCH *ET AL.*, 1995).

**Tabela 3. Exemplos de genes que sofrem *splicing* alterado em fungos.**

Organismo	Gene(s)	Relação nº Éxons:Íntrons	Evento	Referência
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>cbhl</i>	3:2	1º íntron retido	SIMS <i>ET AL.</i> , 1994
<i>P. chrysosporium</i>	<i>cbhl1</i>	6:7	(1) 2º íntron retido (2) 3º íntron retido	TEMPELAARS <i>ET AL.</i> , 1994; BIRCH <i>ET AL.</i> , 1995
<i>P. chrysosporium</i>	Família de genes <i>lip</i>	4-6:3-5	diversos	BRODA <i>ET AL.</i> , 1996; MACARENA <i>ET AL.</i> , 2005
<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>xyl5</i>	5:4	3º íntron retido	GOMEZ-GOMEZ <i>ET AL.</i> , 2001
<i>T. reesei</i>	<i>hex1</i>	2:1	1º íntron retido	CURACH <i>ET AL.</i> , 2004
<i>P. chrysosporium</i>	Família <i>mco</i>	15-20:14-19	diversos	LARRONDO <i>ET AL.</i> , 2004
<i>T. harzianum</i>	<i>gla66</i>	1:0	Região 5'-UTR removida ou retida	DE LAS MERCEDES DANA & PINTOR-TORO 2005
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>tlgu</i>	5:4	4º íntron retido	THORSEN <i>ET AL.</i> , 2006

O processamento dos genes da família *lip* de *P. chrysosporium* apresentam inúmeras variantes. Análises da seqüência dos íntrons retidos mostram códons de parada em fase, o que impediria a síntese de uma proteína funcional (BRODA *ET AL.*, 1996; MACARENA *ET AL.*, 2005). Além desta família, a família dos genes *com*, também de *P. chrysosporium*, sofre *splicing* alterado, gerando diversas formas de transcritos. Da mesma forma, os íntrons retidos apresentam códons de parada em fase, originando proteínas não

funcionais (LARRONDO *ET AL.*, 2004). No caso do gene *xy15*, ensaios de RT-PCR revelaram que o transcrito parcialmente processado – e, portanto maior – era mais abundante em todas as condições de cultivo, o que sugere uma importância biológica, ainda não comprovada, de acúmulo de transcritos a serem completamente processados para utilização quando necessário (GOMEZ-GOMEZ *ET AL.*, 2001).

Em *T. reesei*, o transcrito alterado originado a partir do gene *hex1* apresenta uma região rica em histidinas maior que o transcrito totalmente processado, o que daria origem a proteínas com interação hidrofóbica maior, auxiliando na formação de corpos de Woronin, que são vesículas derivadas do peroxissomo e têm como função isolar poros gerados na parede celular causados por danos. Além disso, uma região extensa e com pouca homologia a outras proteínas do tipo HEX é eliminada (CURACH *ET AL.*, 2004). Em *T. harzianum*, o gene *gla66* apresenta uma peculiaridade, que depois também fora observada em outros genes que sofrem *splicing* alterado. O gene *gla66* possui um íntron na região 5'-UTR, logo antes do sítio de início de tradução. Esta região pode sofrer ou não *splicing* alterado dependendo de onde inicia a transcrição. Como o promotor do gene apresenta pequenas uORF, acredita-se que transcritos longos – que iniciariam em uma destas uORF – manteriam este íntron na região 5'. Isso seria devido à provável inibição da ligação do spliceossomo. Porém todos os outros íntrons seriam removidos, caracterizando o *splicing* alterado. Esta forma de transcrito apresenta níveis de expressão maiores em condições de estresse nutricional e não seria traduzida, pois, se mantida a região 5'-UTR, impediria a ligação dos ribossomos. Já a forma completamente processada teria sua transcrição iniciada na região que

permitiria a ligação do spliceossomo para a remoção do íntron à montante do sítio de início de tradução e permitiria a síntese da proteína. Neste caso, o *splicing* alterado teria função no controle da expressão gênica (DE LAS MERCEDES DANA & PINTOR-TORO 2005).

Em outro caso, o gene *tigu* de *Thermomyces lanuginosus* apresenta *splicing* alterado e não leva à produção de isoformas. Este estudo indica que existem isoformas da enzima, mas que diferentes genes as codificam, como demonstrado por ensaios de espectrometria de massas (THORSEN *ET AL.*, 2006).

Ao que tudo indica, o evento de *splicing* alterado é tão comum quanto o *splicing* alternativo. Porém, o real papel na biologia dos organismos ainda não está totalmente esclarecido. Estudos mais detalhados da participação deste tipo de processamento de pré-mRNAs no controle da expressão e na produção de proteínas alternativas são necessários, em especial em fungos filamentosos.

### 3. Contextualização

Este trabalho faz parte da linha de pesquisa desenvolvida no laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos, cujo foco é descrever o processo de infecção de *M. anisopliae* sobre seus hospedeiros, identificando e caracterizando genes e proteínas envolvidos.

Para tanto, o grupo vem analisando a regulação da expressão gênica e a secreção de hidrolases de *M. anisopliae* em experimentos controlados que mimetizam as condições para o desenvolvimento da patogenia do fungo sobre seus hospedeiros.

Neste contexto, esta Tese descreve o estudo do gene *chi2*, que codifica para uma endoquitinase de 42 kDa. Este gene foi caracterizado e os padrões de expressão e localização celular da enzima foram determinados. Propomos ainda que a quitinase CHI2 está envolvida no processo de infecção de insetos e que o gene produz duas espécies de mRNA que são traduzidas. Com o intuito de organizar os resultados destes estudos e a sua discussão, a Tese foi dividida em dois Capítulos:

Capítulo I, intitulado “Estudo da função do gene *chi2* de *M. anisopliae*”, discute o papel do gene *chi2* e de sua proteína correspondente durante o desenvolvimento do fungo e durante o processo de patogênese;

e

Capítulo II, intitulado “Estudo do processamento diferencial do gene *chi2*”, versa sobre a análise do padrão de *splicing* diferencial do gene *chi2* e a possível função deste processamento diferencial na Biologia do fungo.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo Geral

Elucidar a função do gene *chi2* e da sua respectiva quitinase na biologia do fungo filamentosso *M. anisopliae*.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Análise do perfil transcricional do gene *chi2* e da secreção da quitinase CHI2 em diferentes condições de cultivo de *M. anisopliae*;
- Construção de mutantes superexpressando o gene *chi2* utilizando Agro-transformação;
- Construção de mutantes nulos para o gene *chi2* utilizando Agro-transformação;
- Caracterização molecular e bioquímica dos mutantes supracitados;
- Localização celular da quitinase CHI2 por microscopia de imunofluorescência.
- Avaliação do padrão de *splicing* do gene *chi2* utilizando diferentes técnicas;
- Avaliação da produção de duas proteínas a partir do gene *chi2*.

## 5. Capítulo I - Estudo da função do gene *chi2* de *M. anisopliae*

### 5.1. Introdução

O gene *chi2* foi previamente caracterizado pelo nosso grupo. A ORF do gene *chi2*, de cópia única, contém 1.542 pb e é interrompida por dois íntrons, de 210 e 72 pares de base. A região promotora possui elementos de regulação condizentes com quitinases de outros fungos filamentosos, como a região CREA (responsável pela repressão por catabólito de carbono), além de CAAT *box* e TATA *box*. (BARATTO ET AL., 2006).

Filogeneticamente, a endoquitinase CHI2 agrupa-se com outra quitinase (CHIT30) de *M. anisopliae* (BARATTO ET AL., 2006), que possui atividades tanto de *exo* quanto de *endo*quitinase, e que foi demonstrado ser secretada durante a infecção de *M. anisopliae* sobre *R. (Boophilus) microplus* (DA SILVA ET AL., 2005). Assim como outros genes de quitinases de *M. anisopliae*, o gene *chi2* é reprimido por glicose, mas induzido por baixas e altas concentrações de GlcNAc e quitina cristalina, além de ser induzido em presença de cutícula de *R. (Boophilus) microplus*.

Posto isso, o gene *chi2* e a quitinase por ele codificada tornam-se alvos interessantes no estudo da elucidação do processo de infecção de *M. anisopliae*. Neste trabalho, foram gerados, por ATMT, mutantes que superexpressam e que possuem expressão nula do gene *chi2*. Os mutantes foram caracterizados quanto à expressão do gene e da enzima nas mesmas condições da linhagem selvagem, além de bioensaios. Também foi realizada a localização celular de CHI2 por microscopia de imunofluorescência.

## 5.2. Material e Métodos

### 5.2.1. Soluções e meios de cultivo

#### 5.2.1.1. Meio de Cove completo – MCc (COVE 1966)

Nitrato de Sódio (NaNO <sub>3</sub> )	- 0,6 % (m/V)
Glicose	- 1 % (m/V)
Peptona	- 0,2 % (m/V)
Extrato de Levedura	- 0,05 % (m/V)
Caseína Hidrolisada	- 0,15 % (m/V)

Dissolver em água destilada e ajustar o pH para 6.0. Esterilizar utilizando autoclave. Adicionar assepticamente 2% de Solução de Sais (item 5.2.1.2) e 0,04% de Solução de Elementos Traços (item 5.2.1.3) no momento do uso.

#### 5.2.1.2. Solução de Sais

Cloreto de Potássio (KCl)	- 2,6 % (m/V)
Sulfato de Magnésio heptaidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	- 2,6 % (m/V)
Fosfato de Potássio Monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	- 7,6 % (m/V)

Dissolver em água destilada e esterilizar por autoclavagem.



**5.2.1.3. Solução de Elementos Traços**

Borato de Sódio heptaidratado ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (m/V)	-	0,004%
Sulfato de Cobre pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	-	0,04% (m/V)
Sulfato de Ferro ( $\text{FeSO}_4$ )	-	0,0001% (m/V)
Sulfato de Manganês diidratado ( $\text{MnSO}_4$ ) (m/V)	-	0,08 %
Molibdato de Sódio diidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	-	0,08 % (m/V)
Sulfato de Zinco heptaidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	-	0,08 % (m/V)

Adicionar HCl concentrado até a completa dissolução dos sais. Esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.4. Solução de Tween-80 0,01 % (V/V)**

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

Dissolver em água destilada. Esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.5. Meio de Luria-Bertani – LB**

Triptona	-	1 % (m/V)
Extrato de Levedura	-	0,5 % (m/V)
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	1 % (m/V)

Dissolver em água e ajustar o pH para 7.0. Esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.6. Solução de Glicerol 10 % (V/V)**

Glicerol - 10 % (V/V)

Dissolver em água destilada. Esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.7. Tampão Tris-EDTA – TE**

Tris.Cl pH 8.0 - 10 mM

EDTA - 1 mM

Diluir em água Milli-Q e autoclavar.

**5.2.1.8. Meio de Indução – IM (Covert, 2000)**

Sais MM (item 5.2.9) - 1 x

Glicose - 10 mM

Glicerol - 0,5 % (V/V)

Sulfato de Amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) - 5 mg.mL<sup>-1</sup>

Dissolver em água destilada e autoclavar. No momento do uso, adicionar asepticamente MES 40 mM (item 5.2.10).

**5.2.1.9. Sais MM 2,5 x**

Fosfato de Potássio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	- 0,36 % (m/V)
Fosfato de Potássio Dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	- 0,51 % (m/V)
Cloreto de Sódio (NaCl)	- 0,37 % (m/V)
Sulfato de Magnésio Heptaidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	- 0,12% (m/V)
Cloreto de Cálcio Diidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	- 0,016% (m/V)
Sulfato de Ferro Heptaidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	- 0,00062 % (m/V)

Adicionar os sais em água destilada e HCl até a completa dissolução.

Esterilizar por autoclavagem.

**5.2.10. Solução MES 1 M**

Dissolver 19,52 g de MES em 80 mL de água destilada. Ajustar o pH para 5,3 utilizando KOH 5 M. Completar o volume para 100 mL e esterilizar por filtração em filtros contendo poros de 45  $\mu\text{m}$ . Armazenar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

**5.2.1.11. Solução de Acetoseríngona 10 mM – AS**

Adicionar 0,0196 g de Acetoseríngona em 10 mL de DMSO. Armazenar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

**5.2.1.12. Meio *top* MM**

Glicose	- 1 % (m/V)
Nitrato de Sódio (NaNO <sub>3</sub> )	- 0,6 % (m/V)
Ágar	- 1,5 % (m/V)

Esterilizar por autoclavagem. Após, adicionar assepticamente solução de sais 2 % (item 5.2.1.2), elementos traços 0,04% (item 5.2.1.3), cefotaxima 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (item 5.2.1.11) e glifosinato de amônio 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (item 5.2.1.12).

**5.2.1.13. Solução de Cefotaxima 100  $\text{mg.mL}^{-1}$** 

Injeta-se 10 mL de água estéril em um frasco contendo 1 g de Mefoxin<sup>®</sup> (Merck). Mistura-se bem até a completa dissolução do antibiótico e armazenar a 4 °C.

**5.2.1.14. Solução de Glifosinato de Amônio 40  $\text{mg.mL}^{-1}$** 

A partir da formulação comercial Finale<sup>®</sup> (Bayer) é feito um tratamento com n-butanol para a remoção de compostos não desejados, como corantes e detergentes. Mistura-se o composto a n-butanol em uma proporção de 1:1. Após decantação em funil de separação, a fase inferior é recuperada e a superior descartada. Repete-se o processo de tratamento com n-butanol, recupera a fase inferior e armazena-se a 4 °C.

**5.2.1.15. Solução de Pré-hibridização**

SSC (item 5.2.1.13)	- 5 x
Reagente de Denhardt (item 5.2.1.14)	- 5 x
SDS	- 0,1 % (m/V)

Dissolver todos os reagentes em água destilada no momento do uso.

**5.2.1.16. Solução de SSC 20 x**

Cloreto de Sódio (NaCl)	- 3 M
Citrato de Sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ )	- 0,3 M

Dissolver em água destilada, ajustar o pH para 7 com HCl e esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.17. Reagente de Denhardt 50 x**

FICOLL 400	- 1 % (m/V)
Polivinilpirrolidona	- 1 % (m/V)
Albumina Sérica Bovina (Fração V)	- 1 % (m/V)

Dissolver em água destilada, filtrar em filtros de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenar a -20 °C.

**5.2.1.18. Solução de glicose 1% (m/V)**

Glicose - 1 % (m/V)

Esterilizar por passagem em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Armazenar em temperatura ambiente.

**5.2.1.19. Solução de IPTG 0,8 M**

IPTG - 20 % (m/V)

Dissolver em água destilada e esterilizar por filtração em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Armazenar a -20 °C.

**5.2.1.20. Meio Mínimo – MM**

Nitrato de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) - 0,6 % (m/V)

Fonte de carbono (glicose, quitinase cristalina ou GlcNAc)

Adicionar os reagentes em água destilada e esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.21. Tampão PBS 10 X**

Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ) - 8 % (m/V)

Cloreto de Potássio ( $\text{KCl}$ ) - 0,2 % (m/V)

Fosfato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) - 1,44 % (m/V)

Fosfato de Potássio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) - 0,24 % (m/V)

Dissolver os sais em água destilada e esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.22. Tampão PBS 1 X/Tween-20 0,1 % e 0,5 %**

PBS (item 5.2.1.18)	- 1 x (V/V)
Tween-20	- 0,1 ou 0,5 % (V/V)

Adicionar os reagentes em água destilada no momento do uso.

**5.2.1.23. Solução colorimétrica**

DMAB	- 1 % (m/V)
Ácido clorídrico (HCl)	- 1,25 % (V/V)

Dissolver os reagentes acima em ácido acético glacial no momento do uso.

**5.2.1.24. Tampão de fixação**

Formaldeído	- 3,7 % (V/V)
PIPES (item 5.2.1.25)	- 50 mM
Sulfato de Magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	- 5 mM
EGTA	- 25 mM

Adicionar todos os reagentes em água no momento do uso.

**5.2.1.25. Tampão PIPES 250 mM pH 6,7**

Dissolver 75,6 g de PIPES em 70 mL de água. Ajustar o pH para 6.7 com NaOH 5 M. Esterilizar por autoclavagem.

**5.2.1.26. Tampão PEM**

PIPES (item 5.2.1.21)	- 50 mM
EDTA	- 25 mM
Sulfato de Magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	- 5 mM

Diluir todos os reagentes em água no momento do uso.

**5.2.1.27. Tampão de digestão**

<i>Lysing Enzymes from T. harzianum</i> (Sigma)	- 50 mg.mL <sup>-1</sup>
EDTA pH 7	- 5 mM

Dissolver os reagentes em uma solução de água e clara de ovo filtrada em filtros de poros de 0,45 µm na proporção de 1:1.

**5.2.1.28. Tampão de extração**

PIPES (item 5.2.1.25)	- 100 mM
EDTA pH 7	- 25 mM
Nonidet P-40	- 0,1 % (V/V)

Dissolver todos os reagentes em água destilada no momento do uso.

**5.2.1.29. Tampão de bloqueio**

Albumina Sérica Bovina (Fração V)	- 2,5 % (m/V)
Leite em pó desnatado	- 1 % (m/V)
Soro Fetal Bovino Inativado	- 8 % (m/V)



Adicionar todos os reagentes em água destilada no momento do uso.

#### **5.2.1.30. Solução de PBS 1 x/BSA 3 % (m/V)**

PBS (item 5.2.1.18)	- 1 x
Albumina Sérica Bovina (Fração V)	- 3 % (m/V)

Adicionar todos os reagentes no momento do uso.

#### **5.2.1.31. Solução de DAPI 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>**

Adicionar 2 mL de água destilada filtrada em filtros com poros de 0,22 µm em um frasco contendo 5 g de DAPI. Diluir a 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> para uso.

### **5.2.2. Microrganismos utilizados**

A linhagem E6 do fungo filamentososo *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi utilizada como linhagem selvagem (WT) neste trabalho. Foi isolada a partir do cercopídeo *Deois flavopicta* no estado do Espírito Santo (cedida pelo Prof. João Lúcio de Azevedo - ESALQ/USP) e previamente caracterizada (FRAZZON ET AL., 2000). Esta linhagem não possui registros de utilização comercial e tem características de linhagem generalista considerando a gama de hospedeiros a ela suscetível.

A linhagem XL1-Blue (Stratagene) de *E. coli* foi utilizada para as manipulações de DNA de acordo com procedimentos padrão (SAMBROOK & RUSSEL 2001). Para a expressão de CHI2, a linhagem BL21(DE3) pLys-S (Novagen) de *E. coli* foi utilizada de acordo com as recomendações do

fabricante. A linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* foi utilizada para os eventos de agro-transformação.

### **5.2.3. Manutenção da linhagem E6 de *M. anisopliae***

A linhagem E6 foi inoculada em meio MCc (item 5.2.1.1) sólido adicionado de 2% de solução de sais (item 5.2.1.2) e 0,04% de elementos traços (item 5.2.1.3) a 28 °C até a esporulação (7-10 dias).

### **5.2.4. Suspensão de conídios**

Placas de Petri contendo esporos, foram vertidos 3 mL de uma solução de Tween-80 (item 5.2.1.4). Com alça de Drigalsky, o fundo da placa foi friccionado com o intuito de remover os conídios presentes e dispersá-los na solução adicionada. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a suspensão foi transferida a um tubo do tipo *Falcon* estéril. O conteúdo foi, então, centrifugado a 4.000 g por 7 min. O sobrenadante foi descartado e água Milli-Q estéril foi adicionada, ressuspensando os conídios, para a retirada do Tween-80 ainda presente. A suspensão foi centrifugada a 4.000 g por 7 min novamente. Descartou-se o sobrenadante e 2 mL de água Milli-Q estéril foram adicionados e conídios ressuspensados com o auxílio de um *Vortex*. A suspensão teve sua concentração determinada utilizando câmara de Neubauer e foi mantida a 4 °C por no máximo 14 dias.

### **5.2.5. Preparação de células eletrocompetentes**

Uma colônia das cepas XL1-Blue ou pLys-S de *E. coli* foi inoculada em 12 mL de meio LB líquido (item 5.2.1.5) contendo o antibiótico apropriado. O frasco foi incubado em agitador de bancada por período *overnight* a 37 °C e 250 RPM. Deste pré-inóculo, 2,5 mL foram inoculados em frascos de 1.000 mL contendo 250 mL de meio LB líquido sem antibiótico. Os frascos foram mantidos em agitação constante a 37 °C e 250 RPM. A cada 30 min, a DO<sub>600</sub> foi checada até atingir valores entre 0,35 e 0,4 unidades de absorbância. Após, os frascos foram prontamente incubados em gelo por 30 min. O cultivo contendo as células foi centrifugado e lavado 3 vezes em 100 mL de água Milli-Q estéril. Após, o total de células foi suspenso em 10 mL de glicerol (item 5.2.1.6) estéril e novamente centrifugado. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% (V/V). Alíquotas de 40 µL foram dispostas em tubos Eppendorf de 0,5 mL, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. As células foram transformadas conforme protocolos padrão (SAMBROOK & RUSSEL 2001).

#### **5.2.6. Preparação e transformação de células quimiocompetentes**

Uma colônia da cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* foi incubada em meio LB líquido (ver item 5.2.1.5) a 180 RPM e 28 °C até obter DO<sub>600</sub> na faixa de 0,4 e 0,5. Os frascos Erlenmeyer foram resfriados no gelo por 15 min e centrifugados a 4.000 g por 15 minutos. As células foram ressuspensas em 0,5 mL de glicerol 10% e CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Alíquotas (0,1 ml) foram feitas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Para a transformação das células, foram adicionados entre 200 e 1.000 ng do plasmídeo desejado. O material foi homogeneizado por branda agitação

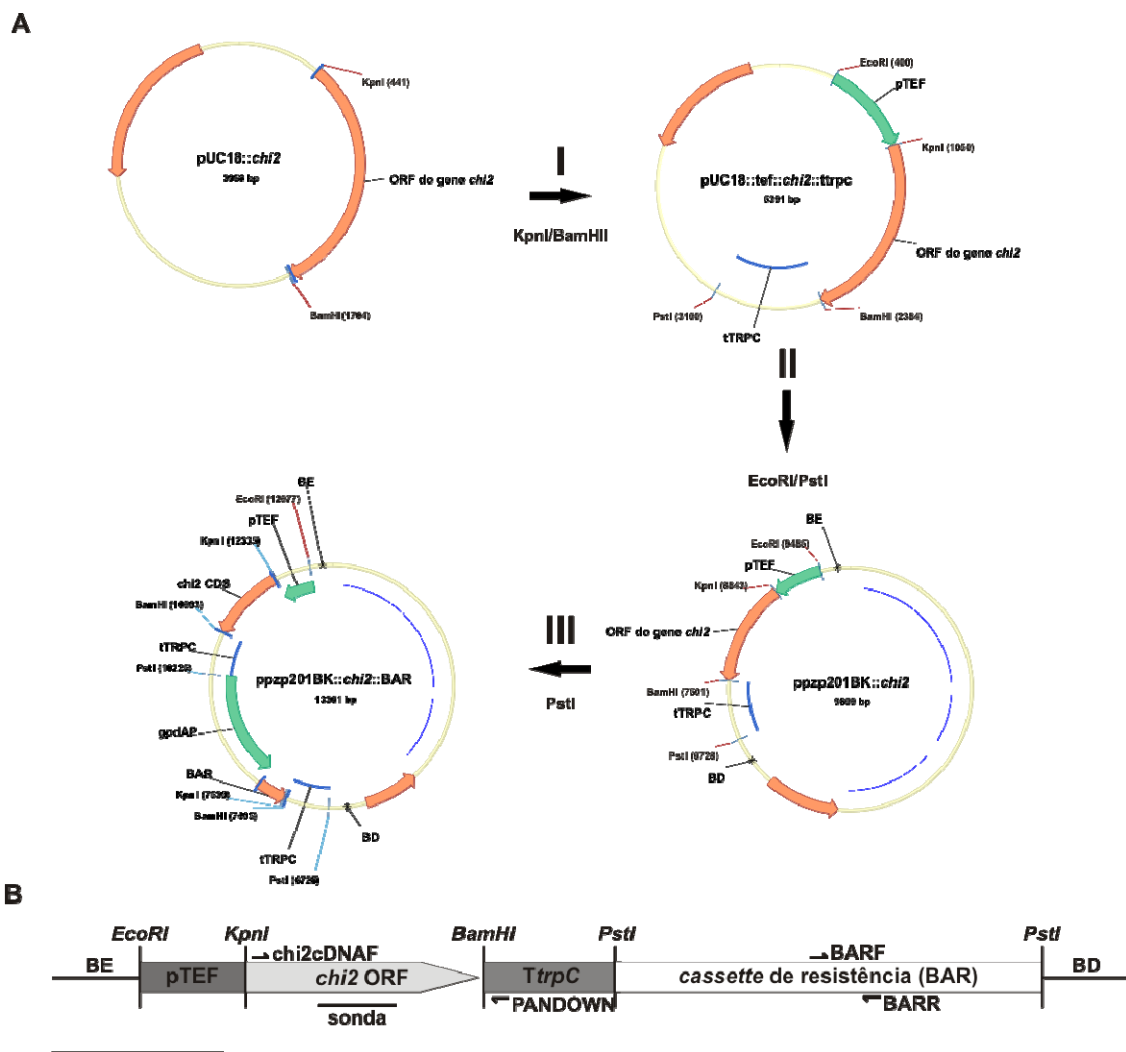
e mantido no gelo por 30 min. Após, o tubo foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e incubado a 37 °C por 5 min. Adicionou-se 1 mL de LB líquido. O conteúdo foi homogeneizado e transferido para um tubo de cultivo, que foi incubado 2 h a 28 °C e 150 RPM. Cerca de 100 µL de LB contendo as células foram, então, plaqueados em LB sólido contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina. As placas foram mantidas por 48 h a 28 °C.

### 5.2.7. Manipulação de ácidos nucléicos

As extrações de DNA e RNA total seguiram os métodos desenvolvidos em nosso laboratório (DUTRA *ET AL.*, 2004; NAKAZATO *ET AL.*, 2006). A síntese de cDNA foi feita utilizando o sistema *SMART* (Clontech). O isolamento de DNA de conídios foi realizado conforme Haugland e colaboradores (1999). Uma alçada de conídios foi colocada em 250 µL de tampão TE (item 5.2.1.7) em tubos Eppendorf de 1,5 mL e submetidos a microondas em potência máxima por 10 min. Após, os tubos foram centrifugados a 10.000 RPM por 10 min e o sobrenadante recolhido a novos tubos. Novamente os tubos foram centrifugados e o sobrenadante recolhido. Utilizou-se 5 µL da extração para experimentos de PCR.

A construção do *cassette* de superexpressão foi realizada utilizando subclonagens dos fragmentos utilizados. Utilizou-se o promotor homólogo e constitutivo do gene *tef1-α* (NAKAZATO *ET AL.*, 2006), cDNA do gene *chi2* contendo o segundo íntron e terminador do gene *trpC* de *A. nidulans*. A ORF do gene *chi2* contendo o segundo íntron foi amplificada utilizando os *primers* CHI2CDNAF e CHI2CDNAR (Tabela 4), adicionando os sítios para as enzimas de restrição KpnI e BamHI. Este *amplicon* foi clonado em pUC18 em sítio de

Smal e sequenciado. Após, este fragmento foi clonado no vetor pTEF/TRPC, entre o promotor do gene *tef1-α* (pTEF) e o terminado do gene *trpC* (TtrpC). Após, o *cassete* foi inserido entre as bordas direita e esquerda do vetor binário pPZP201 de *A. tumefaciens* utilizando os sítios de EcoRI e PstI (COVERT ET AL., 2004). Previamente, foi inserido o *cassete* de expressão do gene *bar* (STAATS ET AL., 2007) em sítio de PstI, que confere aos fungos transformantes resistência ao fungicida glifosinato de amônio (Fig. 5.1).



**Figura 5.1: Construção do *cassete* de superexpressão do gene *chi2*.** A. Sequência de subclonagens para geração do vetor ppzp201BK::*chi2*. BE – borda esquerda do vetor binário de *A. tumefaciens*; BD - borda direita do vetor binário de *A. tumefaciens*. B. Esquema do *cassete* de

superexpressão do gene *chi2*. Os *primers* (*chi2*cDNA, PANDOWN, BARF e BARR; Tabela 4) para a confirmação da construção estão representados, assim como a sonda para ensaios de *Southern blot*. BE – borda esquerda; BD – borda direita. A barra localizada abaixo do esquema representa 1.000 pb.

A construção do *cassette* de deleção utilizou a metodologia de PCR de fusão (YU ET AL., 2004). Três *amplicons* foram obtidos utilizando *primers* desenhados para a construção (Tabela 4). O primeiro *amplicon* corresponde a um fragmento de 660 pb que flanqueia a porção 5' da região codificadora do gene *chi2*; o segundo *amplicon* corresponde a 632 pb que flanqueia a porção 3' da região codante de *chi2*; o terceiro *amplicon* corresponde ao *cassette* de resistência a glifosinato de amônio, contendo 1,8 kb. O produto do PCR de fusão, com 3,5 kb, foi clonado em sítio de *SmaI* no vetor binário pPZP201BK de *A. tumefaciens*. Após, o *cassette* é inserido por recombinação homóloga ao genoma de *M. anisopliae* utilizando agro-transformação (Fig. 5.2).

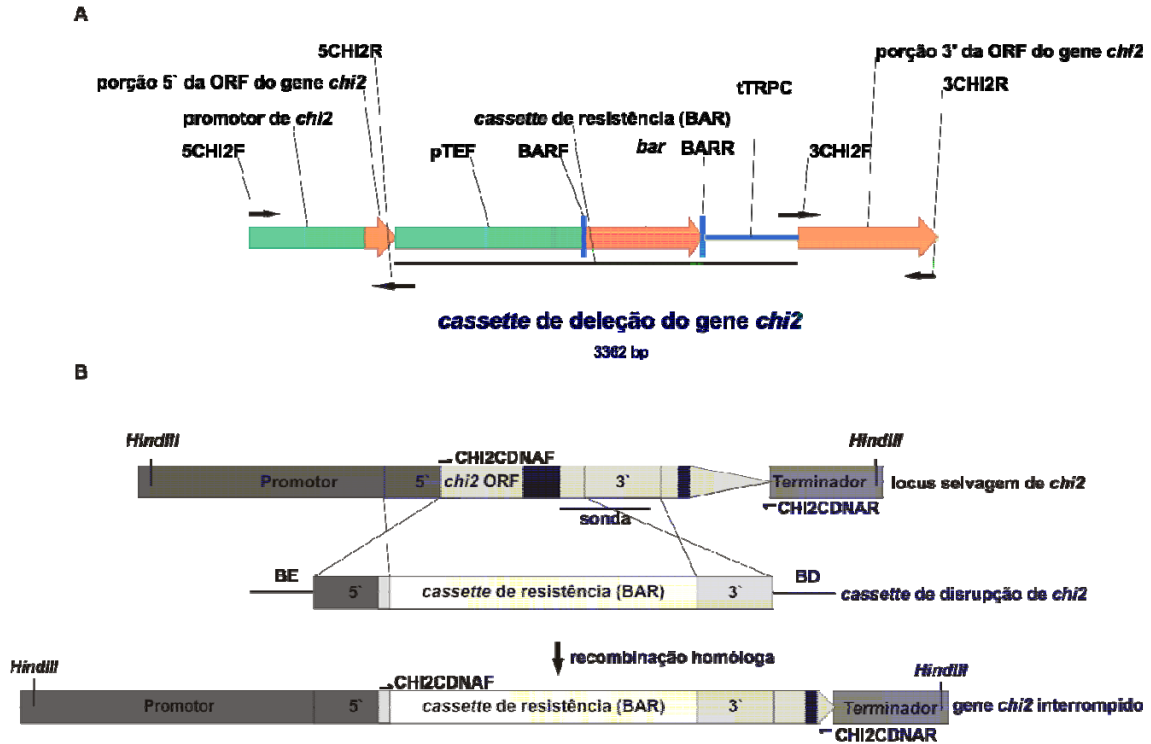
Tabela 4. Lista de *primers* utilizados.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' – 3')	Utilização
CHI2CDNAF	GGTACCAATGCATCATCTACGCGCTC	Amplificação da região codante do gene <i>chi2</i>
CHI2CDNARII	GGATCCTCACCGGCATGACGACCACC	Amplificação da região codante do gene <i>chi2</i>
PANDOWN	TCCAGATTCGTCAAGCTGTTTGA	Confirmação da construção do <i>cassette</i> de superexpressão
BARF	CCATGGCCATGAGCCCAGAACGAC	Amplificação de parte da região codante do gene <i>bar</i>
BARR	GGATCCTCAGATCTCGGTGACGGG	Amplificação de parte da região codante do gene <i>bar</i>
5chi2F	GCAAGACATCAGATCCTCGTGCCC	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chi2</i>
5chi2R	AGTCACCGGTCACTGTACAGCAGTAGACGACATTTT	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chi2</i>
3chi2F	CATGCTCCTCTTTACTCTCGACATTGAAGTCAA	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chi2</i>
3chi2R	CATGCTCCTCTTTACTCTCGACATTGAAGTCAA	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chi2</i>
GFDBARF	CTGTACAGGACCGGTGACT	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chi2</i>
GFDBARR	GAGTAAAGAAGAGGAGCATG	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chi2</i>
Chi2_S_EC	CCATGGATCATCTACGCGCTCTCGTCCG	Amplificação da região codante do gene <i>chi2</i> para inserção em pET-23d
Chi2_A_EC	CTCCAGCCGGCATGACGACCACCAAT	Amplificação da região codante do gene <i>chi2</i> para inserção em pET-23d
Chit2For	GCCCCCTTCAACTACAACAA	RT-PCR
Chit2Rev	ACACATTGGTAAGGGGGAAC	RT-PCR
Chi2F	TTTGAAATGGCGGCAAC	qRT-PCR
Chi2R	GGACTGGCAGGTGTGTATGG	qRT-PCR
tubF	CATCTCTGGTGAACACGGC	qRT-PCR
tubR	AGTTGTCGGGACGGAAAAG	qRT-PCR
qPCR_chi2_exon2_NP_F	GCCTCCGAGTTCTACGCC	qRT-PCR

qPCR\_chi2\_exon2\_NP\_R

CGAGATTCTTTTTTTTTT

qRT-PCR



**Figura 5.2: Inativação do gene *chi2*.** **A.** Esquema demonstra a localização dos *primers* utilizados nos experimentos de PCR de fusão (*overlap*). **B.** Esquema do *cassete* de deleção do gene *chi2*. Os *primers* para confirmação da construção estão evidenciados por setas, assim como a sonda para ensaios de *Southern blot*. BE – borda esquerda; BD – borda direita. A barra abaixo do esquema representa 1.000 pb.

### 5.2.8. Agrotransformação

A transformação de *M. anisopliae* mediada por *A. tumefaciens* foi realizada conforme descrito anteriormente (STAATS ET AL., 2007). Foi preparada uma suspensão de conídios (item 5.2.3) e diluída a  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão foi misturada com o mesmo volume de células bacterianas contendo o vetor binário crescidas até a DO<sub>600</sub> de 0,5 em meio IM (item 5.2.1.8) com ou sem 200  $\mu$ M de AS (item



5.2.1.11) e distribuídos em discos de celofane dispostos sobre IM sólido com ou sem 200  $\mu\text{M}$  de AS. As placas foram incubadas a 25 °C por 2 dias e então cobertas com meio *top* MM (item 5.2.1.12) contendo 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de glifosinato de amônio (item 5.2.1.14). As placas foram transferidas a estufa a 28 °C e visualizadas após 15 d ou após o surgimento de colônias de *M. anisopliae* resistentes ao fungicida. Os transformantes positivos foram selecionados por PCR utilizando DNA isolado a partir de conídios.

#### 5.2.9. Marcação de sonda utilizando fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ )

O fragmento de DNA a ser utilizado como sonda foi marcado pela incorporação de citosinas sintetizadas com o radioisótopo  $^{32}\text{P}$ . Aproximadamente 25 ng de fragmento de DNA foi adicionado em um tubo Eppendorf de 0,5 mL contendo 1  $\mu\text{L}$  de *random primers* e 28  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. O tubo foi aquecido a 95 °C em banho-maria por 5 min. Após, o tubo foi incubado em gelo por 5 min. Ao tubo foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de Tampão de Klenow, 5 mM de dNTP's (exceto citosina), 1 U de fragmento de Klenow, 10  $\mu\text{Ci}$  de dCTP, $\alpha$ - $\text{P}^{32}$  e 12  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. O tubo foi, então, incubado por 1 h a 37 °C. Após, o tubo foi aquecido a 95 °C por 5 min e incubado em gelo por 5 min. A reação foi adicionada diretamente ao tampão de pré-hibridização, já em contato com a membrana, e incubado a 65 °C por 16 h.

#### 5.2.10. Análise por *Southern blot*

Os ensaios de *Southern blot* foram conduzidos conforme protocolo padrão (SAMBROOK & RUSSEL 2001). Foram selecionados, de acordo com os resultados dos ensaios de PCR, transformantes de *M. anisopliae* resistentes a glifosinato de amônio, tanto de ensaios de superexpressão quanto de deleção do gene *chi2*. Os transformantes selecionados foram cultivados em meio MCc líquido (item 5.2.1.1) para obter-se micélio. A partir do micélio, DNA genômico foi extraído. As amostras de DNA foram clivadas com endonucleases de restrição apropriadas e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% por 16 h a 1 v.cm<sup>-1</sup>. Após a eletroforese, as amostras foram eletrotransferidas para membrana de *nylon* e fixadas em forno seco a 80 °C por 2 h e pré-hibridizadas em tampão de pré-hibridização (item 5.2.1.15) por 2 h. Após este período, a sonda referente ao gene *chi2* foi marcada com <sup>32</sup>P (item 5.2.9) e hibridizada por 16 h a 65 °C. Lavagens de 15 min a 65 °C com estringência gradualmente mais altas de SSC (5, 4, 2, 1, 0,5 e 0,1 x) e SDS 0,1 % (m/V) foram feitas para remoção do material não incorporado ou incorporado em regiões inespecíficas. A membrana foi, então, exposta ao *Screen Kodak-K* e a imagem digital dos sinais de hibridização foram obtidas utilizando-se o sistema *Pharos* (Bio-Rad).

#### **5.2.11. Análise dos transcritos por *Northern blot***

Com o intuito de verificar a expressão do gene *chi2*, a linhagem selvagem, bem como as linhagens transformantes selecionadas, foram cultivadas nos seguintes meios de cultura líquidos (MM; item 5.2.1.20) contendo quitina cristalina 1% (m/V), glicose 1% (m/V), GlcNAc 1% (m/V) ou GlcNAc 0,25% (m/V) como únicas fontes de carbono. As amostras foram incubadas em estufa com agitação por 96 h a 28 °C e 150 RPM. Após, o

micélio foi filtrado e o RNA total foi extraído, conforme item 5.2.7. As amostras foram separadas eletroforicamente e as imagens digitais dos resultados foram obtidas. A normalização das amostras foi feita utilizando o sistema *Qubit* (Invitrogen) e análise da densidade de *pixels* utilizando o *software ImageJ* (ABRAMOFF ET AL., 2004). As amostras normalizadas foram separadas em gel desnaturante (item 6.2.1.1) de agarose por 3 h a 100 V. Após a eletroforese, as amostras foram eletrotransferidas utilizando o sistema de transferência *Trans-Blot Cell* (Bio Rad), de acordo com instruções do fabricante, para membranas de *nylon* carregadas positivamente (Hybond-N<sup>+</sup>; GE Healthcare) e fornadas a 80 °C por 2 h. A membrana foi pré-hibridizada por 2 h a 37 °C em tampão de pré-hibridização (item 6.2.1.4). Sondas relativas aos genes teste (*chi2*) e controle (*tub*) foram hibridizadas em ensaios distintos por 16 h a 37 °C após incorporação de fósforo radioativo (<sup>32</sup>P, item 5.2.9). Foram feitas lavagens de 15 min a 37 °C utilizando tampão SSPE em concentrações decrescentes de sal (5, 4, 2 e 1 x) e SDS 0,1 % (m/V) e exposta ao *Screen Kodak-K* e a imagem digital da hibridização foi obtida utilizando o sistema *Pharos* (Bio-Rad). A comparação das intensidades das hibridizações foram calculadas utilizando o *software ImageJ* (ABRAMOFF ET AL., 2004).

#### 5.2.12. Produção de antisoro

Para a produção de antisoro, a região codante do gene *chi2* foi amplificada utilizando os *primers* específicos (Tabela 4). Os produtos da amplificação foram clonados *blunt* no sítio de *SmaI* do vetor pUC18 e seqüenciados. O vetor pET-23d(+) foi clivado utilizando as endonucleases de restrição *NcoI* e *XhoI* e a região codante de *chi2* foi clonada de forma

orientada. O plasmídeo recombinantes foi transformado em BL21(DE3) pLysS competente para expressão heteróloga. As células foram cultivadas em meio LB contendo glicose 1% (item 5.2.1.18) por 2 h e a expressão foi induzida por 0,1 M de IPTG (item 5.2.1.19) por 3 h. As células foram coletadas por centrifugação e a expressão analisada em SDS-PAGE. A proteína recombinante foi parcialmente purificada utilizando a coluna de cromatografia com afinidade a níquel Hi-Trap (GE Healthcare) acoplada ao sistema *Äktapurifier* (GE Healthcare) após solubilização com tampão contendo 6 M de uréia. A fração eluída contendo a quitinase recombinante foi submetida a SDS-PAGE e a banda correspondente foi excisada do gel. Antisero contra CHI2 foi produzido em coelhos brancos New Zealand utilizando procedimentos padrão pela empresa Célula B (CBiot/UFRGS).

### **5.2.13. Análise por *Western blot***

A linhagem selvagem e as linhagens transformadas foram cultivadas de acordo com o item 5.2.12. Após o cultivo, o micélio foi filtrado e o sobrenadante liofilizado e dialisado contra água. O *pellet* resultante foi ressuspensão em 1/10 do volume original e aproximadamente 300 ng de cada amostra foram submetidos a SDS-PAGE. As proteínas foram eletrotransferidas a membranas de PVDF por 16 h a 100 V. As membranas foram bloqueadas em tampão de bloqueio por 2 h a temperatura ambiente, incubadas com os anticorpos primários (1:1.000) em PBS/0,1% Tween-20 (item 5.2.1.22) por 1 h a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes por 10 min cada em PBS/0,1% Tween-20. Após, as membranas foram incubadas na presença dos anticorpos secundários (anti-IgG de coelho conjugados à peroxidase – Sigma Chemicals; 1:2.000) por 1 h a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes em PBS/0,1%

Tween-20. Os sinais de reconhecimento foram gerados utilizando o kit *ECL Plus* (GE Healthcare) e a imagem digital foi obtida utilizando o sistema VersaDoc (Bio-Rad).

#### **5.2.14. Atividade total de quitinases (ULHOA & PEBERDY 1991)**

Cerca de 0,25 mL de sobrenadante de 96 h de cultivo (MM; item 5.2.1.20), dialisados contra água destilada, de *M. anisopliae* tendo como fontes de carbono glicose 1% ou quitina cristalina 1% foram incubados em 0,5 mL de tampão acetato 50 mM contendo 0,5 g de quitina coloidal por 5 h a 37 °C. A reação foi parada por fervura durante 3 min e rapidamente resfriada em gelo. A coloração dos monômeros de GlcNAc foram marcados pela adição de solução colorimétrica (item 5.2.1.23) e a absorbância determinada ( $A_{585}$ ; REISSIG, 1955). Após, foi determinada a atividade total de quitinases presentes em cada ensaio, que foi realizado em triplicata. Uma unidade de quitinases foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de GlcNAc $\cdot\text{min}^{-1}$ . A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando Análise de Variância (ANOVA) e teste de Duncan ( $p < 0,001$ ) pelo software SPSS 13.0.

#### **5.2.15. Atividade específica para endoquitinases**

Os sobrenadantes de cultivo utilizados para os ensaios de atividade total de quitinases (item 5.2.14) foram, também, utilizados para os ensaios de atividade específica de endoquitinases. Incubou-se 0,5 mL do sobrenadante dos cultivos na presença do oligômero de GlcNAc N,N',N''- $\beta$ -D-triacilquitotriose

para detectar-se a atividade de endoquitinases (DA SILVA ET AL., 2005). Os resultados, obtidos a partir de três réplicas experimentais e expressos em pmol/mL.min.µg, foram analisados utilizando Análise de Variância (ANOVA) e teste de Duncan ( $p < 0,001$ ) pelo software SPSS 13.0.

#### **5.2.16. Bioensaios**

Dez machos adultos do inseto manchador do algodão *D. peruvianus*, gentilmente cedidos pela Prof. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, foram dispostos em recipientes plásticos contendo suprimento de água e sementes de algodão para alimentação. Suspensões recém preparadas a  $1 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup> e cada inseto foi imerso por 10 s na suspensão, exceto aqueles pertencentes ao grupo controle, os quais foram imersos em água destilada estéril. Cada uma das 3 réplicas biológicas tiveram 3 réplicas experimentais. A mortalidade dos hospedeiros foi registrada a cada dia, por 10 dias. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e os grupos foram agrupados pelo teste de Duncan ( $p < 0,001$ ) utilizando o software SPSS v. 13.0. Os valores de TL<sub>50</sub> são considerados estatisticamente diferentes se os limites fiduciários não se sobrepõem.

#### **5.2.17. Microscopia de imunofluorescência**

Lamínulas redondas (Boeco) estéreis foram colocadas em poços de placas de 24 poços. Foram incubados  $1 \times 10^5$  esporos/mL de *M. anisopliae* em solução de extrato de levedura 0,05% por 16 horas com o intuito de obter-se células com formação de apressórios. Após, as lamínulas foram incubadas, a

fim de fixar o material biológico, em 500  $\mu\text{L}$  de tampão de fixação (item 5.2.1.24) a 37 °C por 1 h ou a 4 °C *overnight*. As lamínulas foram, então, lavadas 5 vezes em 500  $\mu\text{L}$  de tampão PEM (item 5.2.1.26). As paredes celulares foram removidas com 500  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão (item 5.2.1.27) por 30 min. As lamínulas foram lavadas 3 vezes em 500  $\mu\text{L}$  de tampão PEM e incubadas por 5 min em 500  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (item 5.2.1.28) a 37 °C. Após, foram lavadas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão PEM por 5 min, imersas em 500  $\mu\text{L}$  de metanol absoluto a -20 °C por 10 min e lavadas duas vezes em 500  $\mu\text{L}$  de tampão PEM por 5 min. Antes do tratamento com os anticorpos primários, as lamínulas foram incubadas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão de bloqueio (item 5.2.1.29) por 1 h a 37 °C e lavadas 3 vezes em PBS 1x/Tween 20 0,5% (item 5.2.1.22). O tratamento com os anticorpos primários foi realizado incubando as lamínulas na presença do anticorpo primário (1:100) em 300  $\mu\text{L}$  de PBS 1x/BSA 3% (item 5.2.1.30) por 1 h a 37 °C. As lamínulas foram lavadas 3 vezes em 500  $\mu\text{L}$  de PBS/Tween 20 0,5% por 10 min. Após, as lamínulas foram incubadas em 300  $\mu\text{L}$  PBS/BSA 3% na presença do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado a FITC; 1:50) por 1 h a 37 °C e lavadas 3 vezes em 500  $\mu\text{L}$  de PBS/BSA 3%. Após as marcações de imunofluorescência, as lamínulas foram incubadas em temperatura ambiente com 300  $\mu\text{L}$  de DAPI 0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (item 5.2.1.31) por 10 min, lavadas 3 vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1x e montadas em lâminas com 3  $\mu\text{L}$  de *anti-fading VectaShield HardSet* (Vecta Laboratories). As lâminas foram observadas sob o microscópio *Axioskop 40* (Zeiss) com sistema de emissão de luz UV *HBO 50<sub>AC</sub>* (Zeiss) utilizando os filtros *Filter Set 02* (DAPI; Zeiss) e *Filter Set 38* (FITC; Zeiss). As imagens foram obtidas utilizando

câmera digital *Axiocam MRC* (Zeiss) controlada pelo software *Axiovision v. 4.7.2* (Zeiss).

### 5.3. Resultados

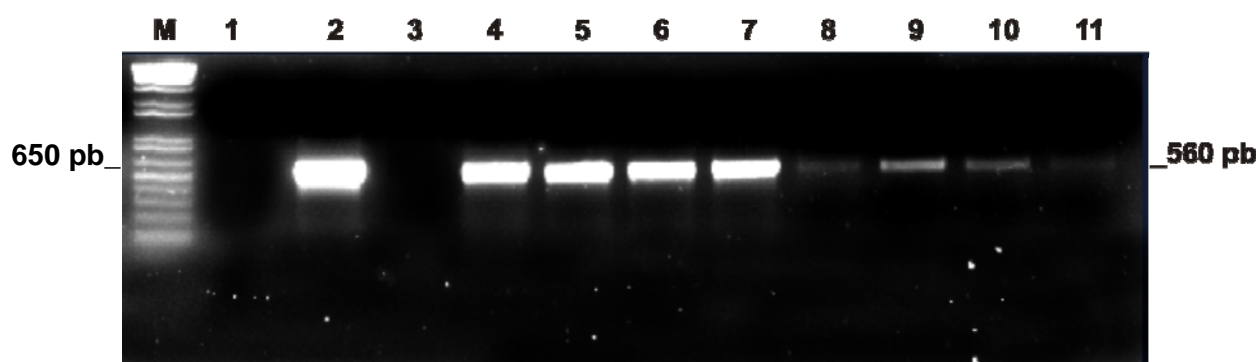
#### 5.3.1. Construção de mutantes superexpressando e com expressão nula do gene *chi2*

Com o intuito de elucidar a função da quitinase codificada pelo gene *chi2*, construímos linhagens superexpressando e com expressão nula deste gene. Para tanto, um *cassete* de superexpressão e outro para o nocaute do gene *chi2* foram construídos.

O *cassete* para superexpressão foi construído por sucessivos experimentos de subclonagens, culminando em um *cassete* de aproximadamente 3,7 Kb (Fig. 5.1). A região codante do gene *chi2* contendo o segundo íntron foi amplificada utilizando os *primers* CHI2CDNAF e CHI2CDNAR (Tabela 4, adicionando à ORF sítios de KpnI e BamHI. Após, este fragmento foi clonado no vetor pUC18 e chamado pUC::*chi2*, que foi sequenciado. Após a confirmação da seqüência de *chi2*, a ORF foi clonada no vetor pTEF/tTRPC entre o promotor constitutivo pTEF e o terminador tTRPC, originando o vetor pTEF::*chi2*. O *cassete* de superexpressão foi então clonado entre as bordas direita e esquerda do vetor binário pPZP201BK de *A. tumefaciens* gerando pPZP::*chi2*. Este vetor clivado com PstI e adicionou-se o *cassete* de resistência à glifosinato de amônio, chamando-se pPZP::*chi2*::bar.

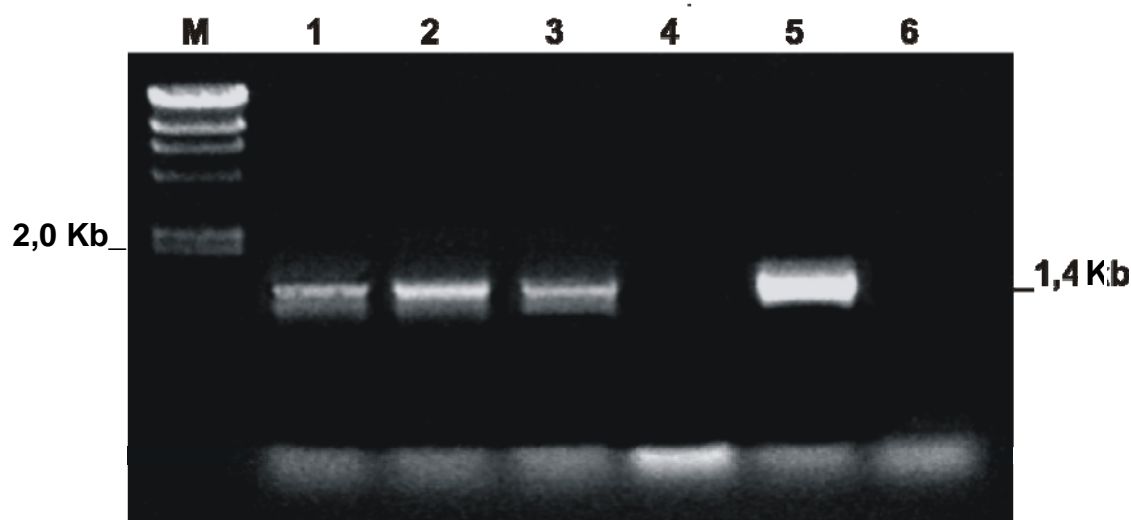


Este vetor foi utilizado para a transformação de células de *A. tumefaciens*, que foram utilizadas em ensaios de agrotransformação de *M. anisopliae*. Foram realizados três experimentos de agrotransformação, resultando em cerca de 150 colônias resistentes a glifosinato de amônio por evento de transformação (nomeadas "T", seguida de numeral). Cerca de 60 colônias foram aleatoriamente analisadas por PCR e todas apresentaram resultados positivos utilizando os *primers* BARF e BARR (Tabela 4, demonstrando a presença do *cassette* de resistência à droga (Fig. 5.3).



**Figura 5.3:** Integração do *cassette* de resistência a glifosinato de amônio no genoma de linhagens transformantes de *M. anisopliae* obtidas por ATMT utilizando o vetor pPZP::*chi2*::*bar*. Amplificação por PCR (*primers* BARF e BARR) de DNA extraído de conídios de colônias aleatórias resistentes a glifosinato de amônio geradas a partir de ensaios de ATMT utilizando o vetor para superexpressão do gene *chi2* pPZP::*chi2*::*bar*. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. (M) Invitrogen 1 Kb DNA Plus Ladder; (1) controle negativo sem DNA molde; (2) controle positivo (vetor pPZP::*chi2*::*bar*); (3) controle negativo (DNA da linhagem selvagem E6); (4) T1; (5) T6; (6) T12; (7) T33; (8) T38; (9) T44; (10) T53; (11) T68.

A partir dos resultados de PCR (Fig. 5.3), selecionamos três transformantes para análise de integração do *cassette* de superexpressão ao genoma de *M. anisopliae*. Análise por PCR utilizando os *primers* CHI2CDNAF e PANDOWN (Fig. 5.4) permitiu avaliar a integração do *cassette* de superexpressão, demonstrando a fusão entre a porção 3' do gene *chi2* e a porção 5' do terminador *tTRPC*.



**Figura 5.4: Integração do *cassette* de superexpressão do gene *chi2* no genoma de linhagens transformantes de *M. anisopliae* obtidas por ATMT utilizando o vetor pPZP::*chi2*::*bar*. PCR (*primers* CHI2CDNAF e PANDOWN) de DNA extraído de conídios. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. (M)  $\lambda$ /HindIII; (1) T6; (2) T12; (3) T33; (4) controle negativo (DNA de E6); (5) controle positivo (vetor pPZP::*chi2*::*bar*); (6) controle negativo sem DNA molde.**

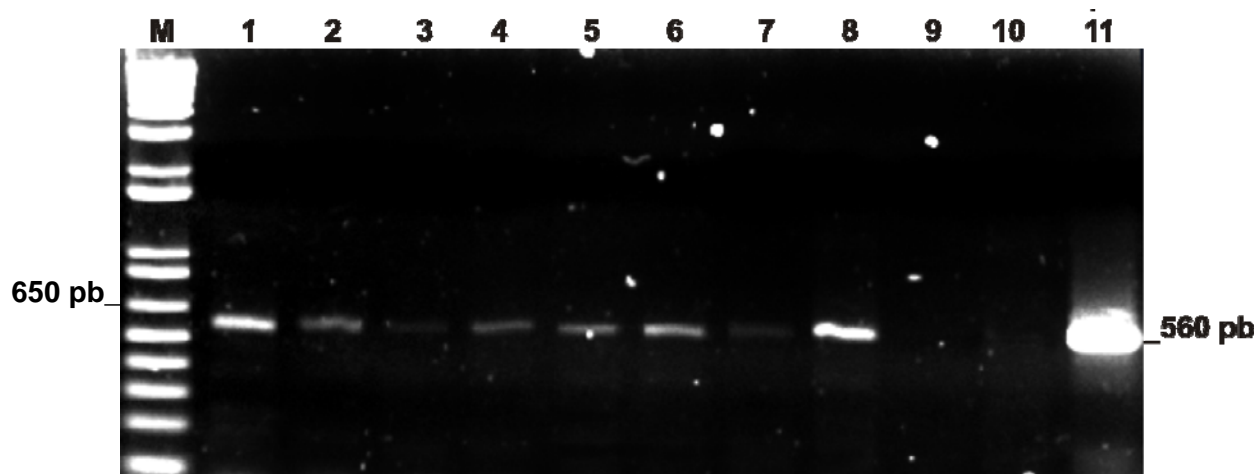
Análises por hibridização de DNA (*Southern blot*) confirmaram a integração do *cassette* de superexpressão no genoma de *M. anisopliae* nos 3 transformantes selecionados. Foi utilizada uma sonda correspondente a 500 pb

da ORF do gene *chi2* (Fig. 5.1), hibridizada em DNA genômico obtido a partir da linhagem selvagem E6 e das linhagens transformantes T6, T12 e T33, digerido com a enzima de restrição EcoRV. Conforme os resultados obtidos, a linhagem selvagem apresentou apenas um única banda de hibridização de 6,5 kb, ao passo que as linhagens T6, T12 e T33 apresentaram um padrão distinto de hibridização. As linhagens T6 e T12 apresentaram uma única banda de 10,3 kb e 10,5 kb cada. A ausência da banda relativa ao locus de *chi2*, como observado na linhagem selvagem, demonstra a interação homóloga do *cassette*. Por sua vez, a linhagem T33, além de apresentar uma banda de 6,7 kb relativa ao *cassette* de superexpressão, apresentou hibridização relativa ao locus de *chi2*, sugerindo integração ectópica do *cassette* (Fig. 5.7 A).

O *cassette* de deleção foi construído utilizando a técnica de PCR de fusão descrita por Yu e colaboradores (2004). A construção do *cassette* foi realizada pela amplificação de três fragmentos: um fragmento de 518 pb da região 5' flanqueadora à ORF do gene *chi2* somado a 142 pb pertencentes à ORF do gene, totalizando um fragmento de 660 pb, um fragmento de 632 pb pertencentes à região 3' flanqueadora à ORF de *chi2* e um fragmento referente ao *cassette* de expressão do gene *bar*, que confere resistência a glifosinato de amônio, conteúdo cerca de 2 kb. A reação de PCR contendo estes fragmentos resultou em um *cassette* de deleção de 3,3 kb. Este fragmento foi clonado no vetor binário pPZP201BK, gerando o vetor pPZP:: $\Delta$ chi2::bar (Fig. 5.2).

O vetor foi utilizado para transformação de *A. tumefaciens* para ensaios de agrotransformação. Um total de três ensaios de agrotransformação foram realizados e obteve-se aproximadamente 50 colônias resistentes a glifosinato de amônio por ensaio. Assim como nos experimentos utilizando o vetor

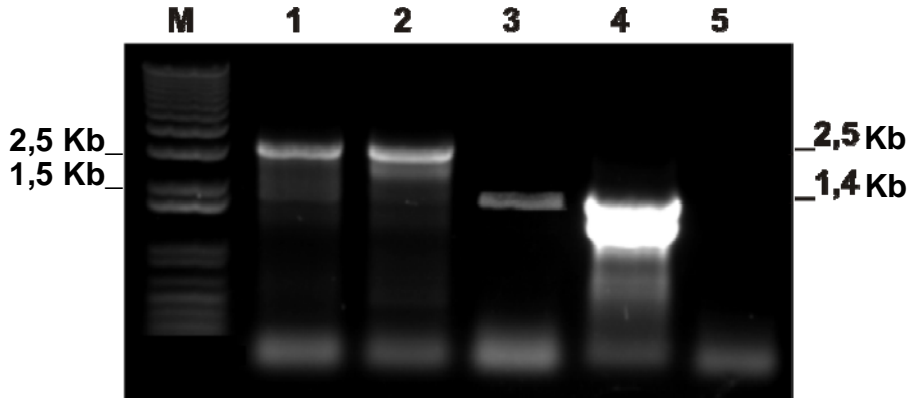
pPZP::*chi2*::*bar*, 50 colônias aleatórias (nomeadas “ $\Delta$ ”, seguida de numeral) foram testadas quanto à presença do *cassette* de interrupção do gene *chi2* inicialmente utilizando os *primers* BARF e BARR, sendo que todas apresentaram amplificação (Fig. 5.5).



**Figura 5.5:** Integração do *cassette* de interrupção do gene *chi2* no genoma de linhagens transformantes de *M. anisopliae* obtidas por ATMT utilizando o vetor pPZP:: $\Delta$ *chi2*::*bar*. PCR (*primers* BARF e BARR) de DNA extraído de conídios de colônias aleatórias resistentes a glifosinato de amônio geradas a partir de ensaios de ATMT utilizando o vetor para superexpressão do gene *chi2* pPZP:: $\Delta$ *chi2*::*bar*. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. (M) Invitrogen 1 Kb DNA Plus Ladder; (1)  $\Delta$ 10; (2)  $\Delta$ 17; (3)  $\Delta$ 20; (4)  $\Delta$ 22; (5)  $\Delta$ 25; (6)  $\Delta$ 29; (7)  $\Delta$ 31; (8)  $\Delta$ 47; (9) controle negativo (sem DNA molde); (10) controle negativo (DNA genômico de E6); (11) controle positivo (pPZP:: $\Delta$ *chi2*::*bar*).

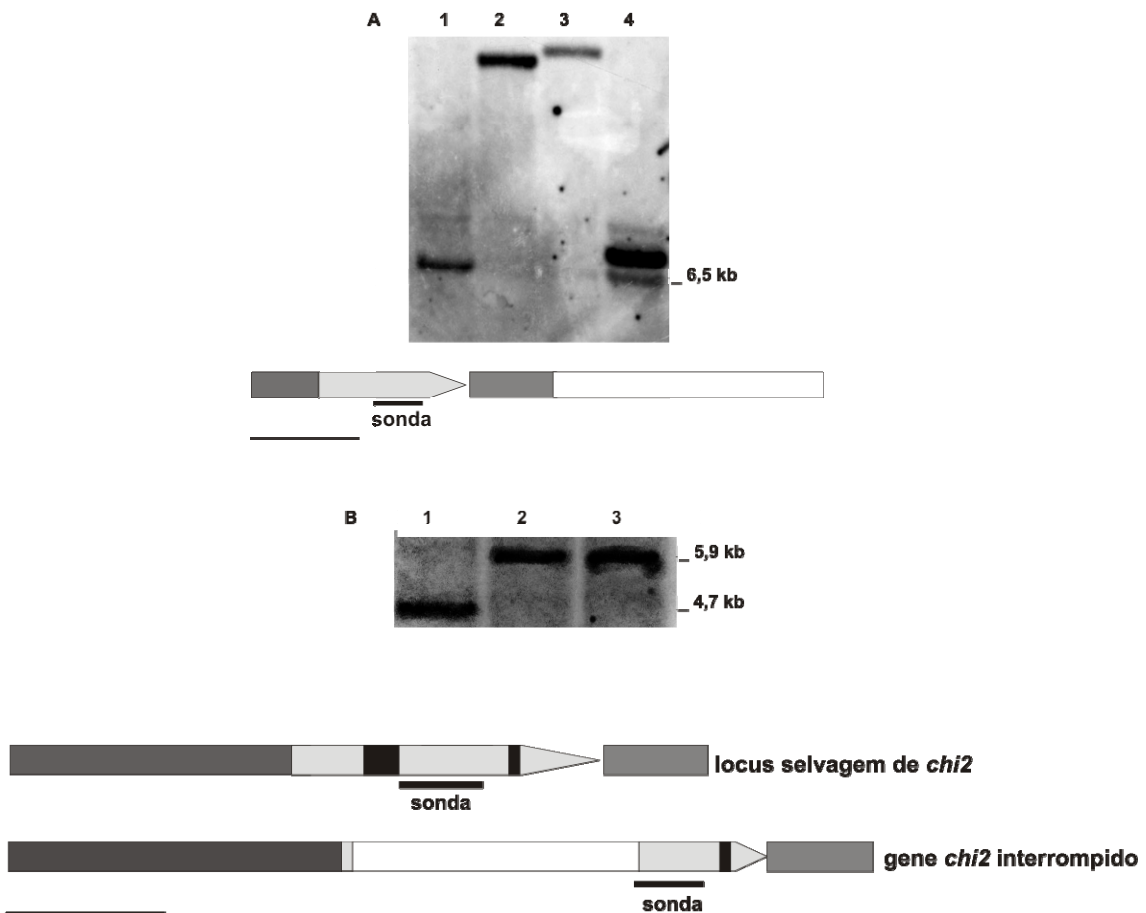
As colônias avaliadas por PCR quanto à integração do *cassette* de interrupção foram submetidas à PCR para confirmação da integração do *cassette* no sítio homólogo. Das 50 colônias testadas, apenas 2 sofreram recombinação homóloga (Fig. 5.6). DNA genômico foi extraído e submetido à digestão com a endonuclease HindIII. A linhagem E6 apresentou uma única

banda de hibridização de 4,7 Kb e os transformantes  $\Delta 22$  e  $\Delta 25$  apresentaram uma única banda de 5,9 Kb. A ausência da banda de 4,7 Kb, referente ao locus selvagem de do gene *chi2*, indica recombinação homóloga (*Southern blot*; Fig. 5.7 B).



**Figura 5.6:** Integração homóloga do *cassette* de interrupção do gene *chi2* no genoma de linhagens transformantes de *M. anisopliae* obtidas por ATMT utilizando o vetor pZP:: $\Delta$ *chi2*::*bar*. PCR (*primers* CHI2CDNAF e CHI2CDNAR) de DNA extraído de conídios. (M) Invitrogen 1 Kb DNA Plus Ladder; (1)  $\Delta 22$ ; (2)  $\Delta 25$ ; (3) controle positivo (DNA de E6); (4) controle positivo (pUC18 contendo cópia genômica do gene *chi2*); (5) controle negativo (sem DNA molde).

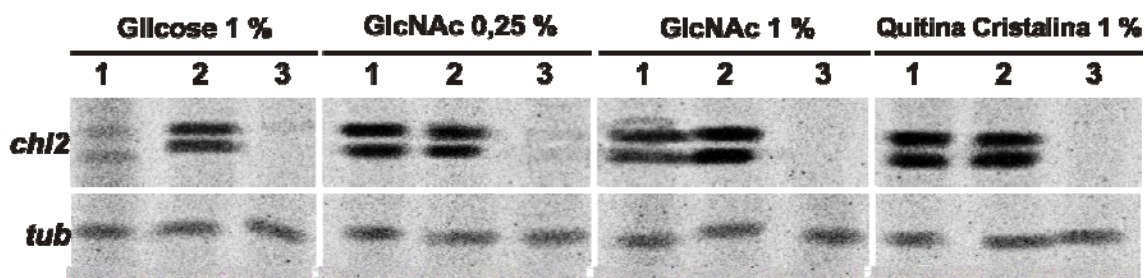
A integração no sítio homólogo foi observada nos transformantes  $\Delta 22$  e  $\Delta 25$  devido à amplificação de apenas uma banda referente ao *cassette* de interrupção, que possui 1,2 Kb, e à ausência da banda referente ao locus do gene *chi2* (Fig. 5.2 e 5.6).



**Figura 5.7: Integração dos cassetes de superexpressão e interrupção do gene *chi2* no genoma de *M. anisopliae*.** **A.** *Cassette* de superexpressão no genoma de *M. anisopliae*. *Southern blot* realizado com amostras de DNA da linhagem selvagem e dos transformantes após digestão utilizando a endonuclease *EcoRV*. (1) E6; (2) T6; (3) T12; (4) T33. **B.** *Cassette* de nocaute do gene *chi2* no genoma de *M. anisopliae*. *Southern blot* realizado com amostras de DNA da linhagem selvagem e dos transformantes após digestão utilizando a endonuclease *HindIII*. (1) E6; (2)  $\Delta 22$ ; (3)  $\Delta 25$ . Os esquemas abaixo representam o local de hibridização da sonda (maiores detalhes Fig. 5.1 e Fig. 5.2). As barras abaixo dos esquemas representam 1 Kb.

### 5.3.2. Caracterização fenotípica dos transformantes T33 e $\Delta 22$

Avaliamos a expressão do gene *chi2* nas linhagens E6 (selvagem), T33 (contendo o *cassette* para superexpressão de *chi2* integrado ao seu genoma) e  $\Delta 22$  (contendo o *cassette* para deleção de *chi2* integrado ao seu genoma em sítio homólogo) em condições de indução e repressão do sistema de quitinases. Para tanto, experimentos de hibridização de RNA foram realizados utilizando RNA obtido a partir de cultivos contendo glicose 1% (m/V) e GlcNAc 1 % (m/V) como condições de repressão e quitina cristalina 1 % (m/V) e GlcNAc 0,25 % (m/V) como condições de indução. Os resultados obtidos indicam que as linhagens contendo o *cassette* de superexpressão integrado ao seu genoma tiveram expressão não-regulada e níveis maiores de expressão quando comparados aos níveis da linhagem selvagem. Em glicose, o gene *chi2* é completamente reprimido, ao passo que na linhagem T33 não há repressão. Em presença de quitina cristalina, GlcNAc 1 % (m/V) ou GlcNAc 0,25% (m/V), o incremento na expressão foi de 2,4, 4,1, e 3,7 x, respectivamente. Não foram detectados transcritos a partir do RNA extraído da linhagem  $\Delta 22$  (Fig. 5.8).



**Figura 5.8: Expressão do gene *chi2*.** *Northern blot* utilizando RNA extraído de meios contendo glicose 1 % (m/V), GlcNAc 0,25 % (m/V), GlcNAc 1 % (m/V) ou quitina cristalina 1 % (m/V) como únicas fontes de carbono após 96 h de cultivo. As sondas utilizadas são fragmentos das ORF's dos genes *chi2* e *tub* ( $\beta$ -tubulina). (1) E6; (2) T33; (3)  $\Delta$ 22.

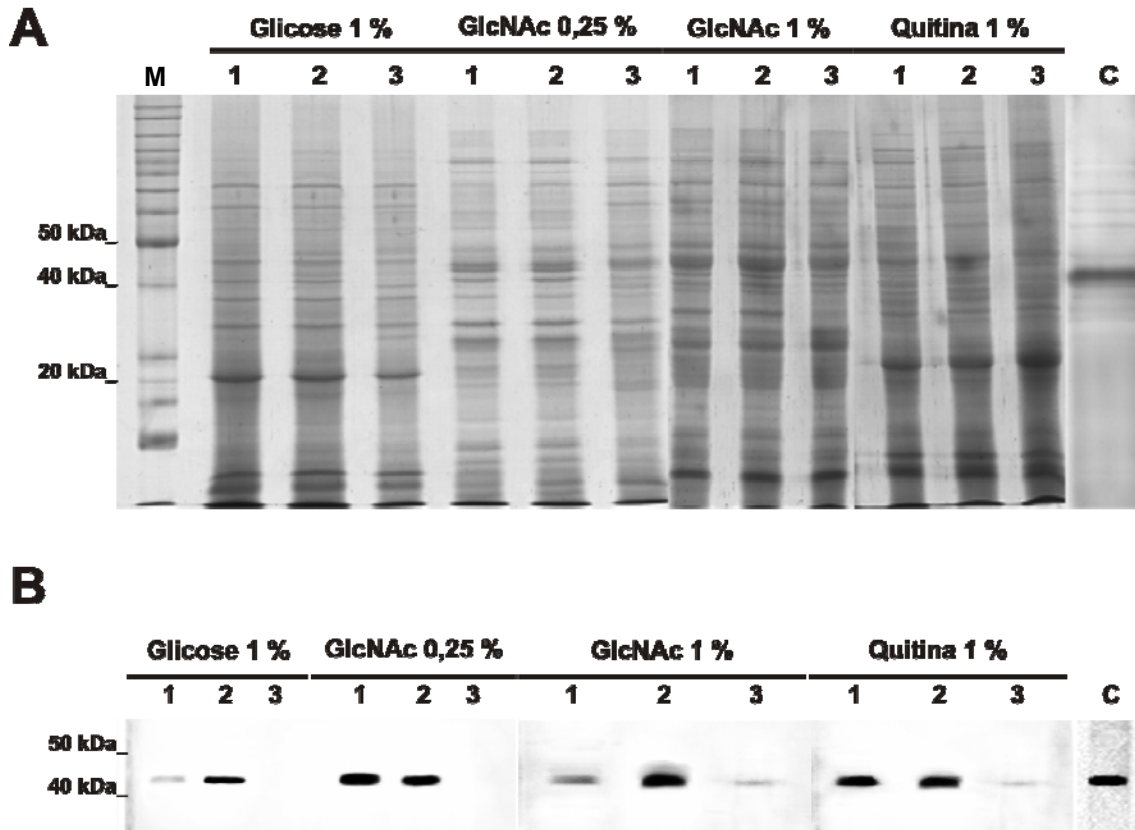
A expressão da quitinase CHI2 também foi avaliada com o intuito de confirmar os resultados obtidos com os transcritos. As linhagens E6, T33 e  $\Delta$ 22 foram cultivadas nas mesmas condições nas quais foram cultivadas para os ensaios de *Northern blot* e proteína total foi extraída para os ensaios de *Western blot*, que foram realizados conforme item 5.2.13 utilizando antisoro anti-CHI2 produzido conforme item 5.2.12.

Os resultados de *Western blot* corroboram os resultados da avaliação da expressão de transcritos de *chi2*. Em meios contendo glicose como única fonte de carbono, a linhagem T33 teve um aumento de 8,7 x em relação à expressão de CHI2 na linhagem selvagem. Não foi observada expressão de CHI2 no meio contendo glicose avaliando a linhagem selvagem. Nos meios contendo GlcNAc 0,5%, a expressão de CHI2 foi 1,5 x maior na linhagem selvagem em comparação à linhagem T33 e não se observou expressão na linhagem  $\Delta$ 22. Quando GlcNAc 1 % (m/V) foi disponibilizada como única fonte de carbono, a

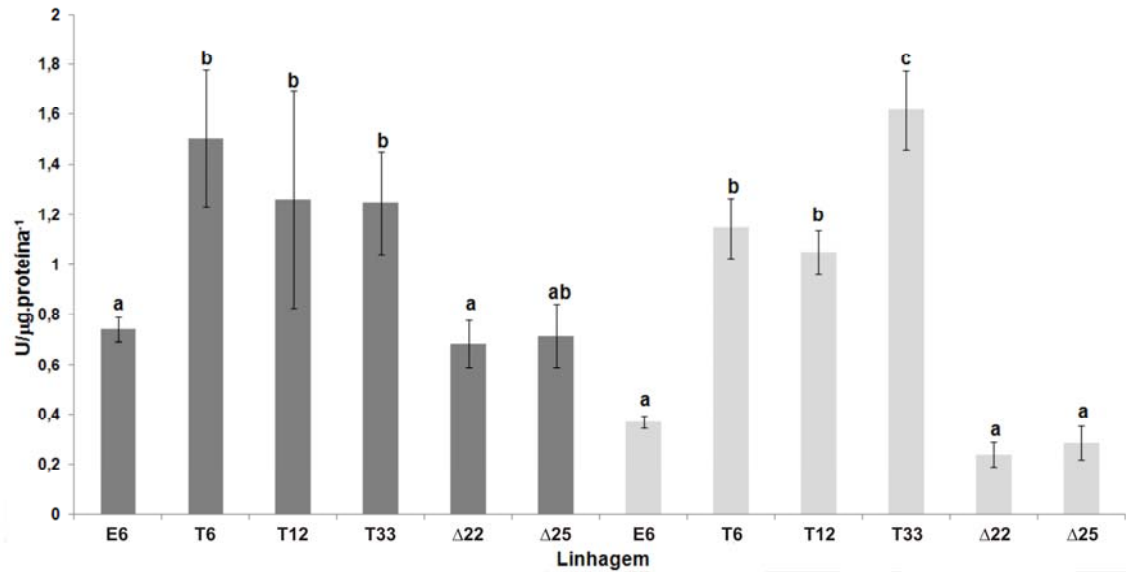


expressão de CHI2 observada na linhagem T33 foi 4,9 x maior em relação à linhagem selvagem. Neste mesmo meio contendo GlcNAc 1 % (m/V), houve reconhecimento do anticorpo anti-CHI2 na amostra referente à linhagem  $\Delta 22$ . Possivelmente esse fato se deve à identidade de aminoácidos entre a quitinase CHI2 e CHIT30 (BARATTO *ET AL.*, 2006), fato que também ocorre nos meios contendo quitina cristalina. Neste meio, os níveis de expressão de CHI2 entre as linhagens selvagem e T33 são semelhantes, sendo que a linhagem T33 expressa 1,2 vezes mais que E6 (Fig. 5.9).

Realizamos a avaliação da atividade de quitinases secretadas por diferentes linhagens do fungo em meios contendo glicose 1 % (m/V) ou quitina cristalina 1 % (m/V) como únicas fontes de carbono com o intuito de mensurar o incremento ou o decréscimo da expressão da quitinase CHI2. Além das linhagens E6, T33 e  $\Delta 22$ , utilizamos as linhagens T6 e T12, obtidas nos experimentos de superexpressão, e a linhagem  $\Delta 25$ , obtida nos ensaios de deleção (Fig. 5.10).

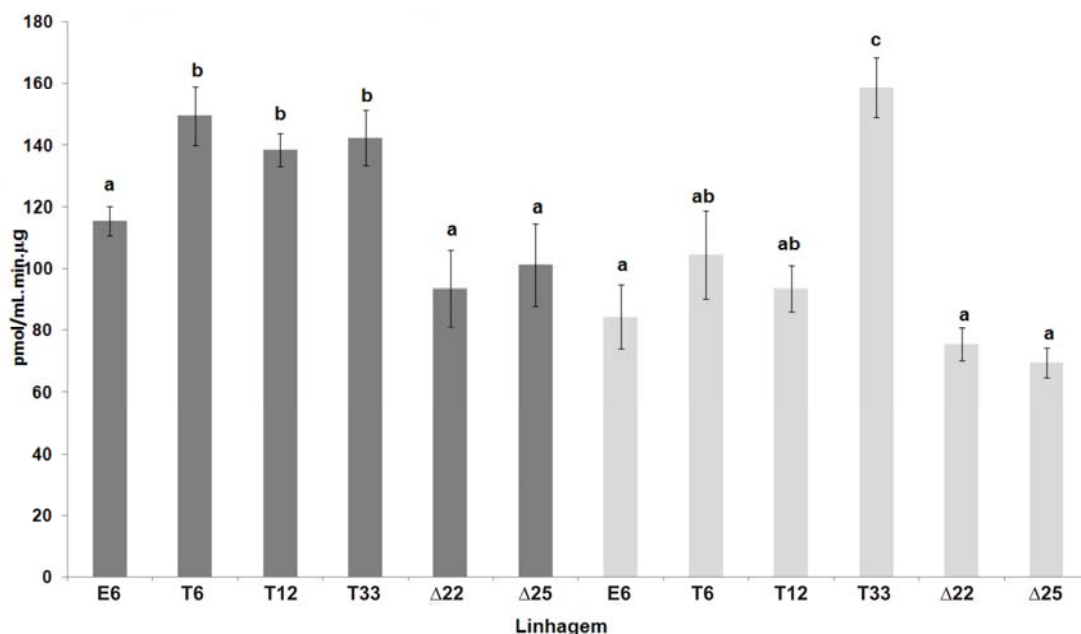


**Figura 5.9: Expressão da quitinase CHI2.** **A.** Amostras de proteína total extraídas de *M. anisopliae* após cultivo em meios contendo diferentes fontes de carbono. (M) Invitrogen *BenchMarker Protein Ladder*; (1) E6; (2) T33; (3)  $\Delta 22$ ; (C) controle positivo (CHI2 recombinante parcialmente purificada). **B.** *Western blot* utilizando antisoro anti-CHI2 avaliando a expressão de CHI2 de linhagens de *M. anisopliae* cultivadas em meios contendo diferentes fontes de carbono. (1) E6; (2) T33; (3)  $\Delta 22$ ; C – controle positivo (CHI2 recombinante parcialmente purificada). Revelação utilizando o kit *ECL Plus* (GE Healthcare).



**Figura 5.10: Atividade de quitinases total secretadas por diferentes linhagens de *M. anisopliae*.** Barras cinza escuro – atividade de quitinases em meio MM acrescido de quitina cristalina como única fonte de carbono; barras cinza claro – atividade de quitinases em meio MM acrescido de glicose como única fonte de carbono. Médias contendo a mesma letra não possuem diferença estatística significativa pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Duncan ( $P < 0,001$ ).

As linhagens T6, T12 e T33 apresentaram valores de atividade de quitinase total maiores que a linhagem E6, ao passo que as linhagens  $\Delta 22$  e  $\Delta 25$  apresentaram valores mais baixos, em ambas as condições. Considerando a natureza da quitinase CHI2, testes de atividade específicos para endoquitinases foram realizados utilizando o oligômero N,N',N''- $\beta$ -D-triacilquitotriose (Fig. 5.11).



**Figura 5.11: Atividade específica de endoquitinases secretadas por diferentes linhagens de *M. anisopliae*.** Barras cinza escuro – atividade de endoquitinases em meio MM acrescido de quitina cristalina como única fonte de carbono; barras cinza claro – atividade de endoquitinases em meio MM acrescido de glicose como única fonte de carbono. Médias contendo a mesma letra não possuem diferença estatística significativa pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Duncan ( $P < 0,001$ ).

Semelhantemente aos ensaios de atividade total de quitinases, os ensaios de atividade específica para endoquitinases evidenciou um incremento na atividade desta classe de quitinases nas linhagens T6, T12 e T33, e um decréscimo nas linhagens  $\Delta 22$  e  $\Delta 25$ .

Tendo em vista as diferenças de expressão de CHI2 dentre as linhagens testadas e nos prováveis papéis das quitinases em fungos filamentosos, em específico fungos filamentosos entomopatógenos, ensaios de microscopia de imunofluorescência, a fim de identificar possíveis alterações

morfológicas nas células das linhagens modificadas, e bioensaios, a fim de verificar a participação de CHI2 nos processos de infecção, foram realizados. Os resultados destes experimentos auxiliarão a elucidar o papel da endoquitinase CHI2.

Bioensaios foram realizados utilizando como hospedeiro o inseto manchador do algodão *D. peruvianus*. Os resultados obtidos demonstram alterações no padrão de infecção de *M. anisopliae* frente a este hospedeiro quando comparados aos resultados obtidos com as linhagens modificadas. A Tabela 5 mostra os valores de TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub> da linhagem selvagem e das linhagens modificadas.

**Tabela 5. Valores de TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub> das linhagens de *M. anisopliae* avaliadas em bioensaios utilizando o inseto *D. peruvianus*.**

Linhagem	TL <sub>50</sub> (h) <sup>*</sup> (95% limites fiduciários)	TL <sub>90</sub> (h) <sup>*</sup> (95% limites fiduciários)
E6	156,30 (150,84-162,43)a	209,46 (199,60-222,23)a
T33	125,57 (121,99-129,16)b	154,75 (149,75-161,0)b
Δ25	186,56 (172,3-208,21)c	267,59 (238,38-318,48)c

<sup>#</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste *t* (P<0,01).

A curva comparando a mortalidade causada por cada linhagem é apresentada na Figura 5.12.

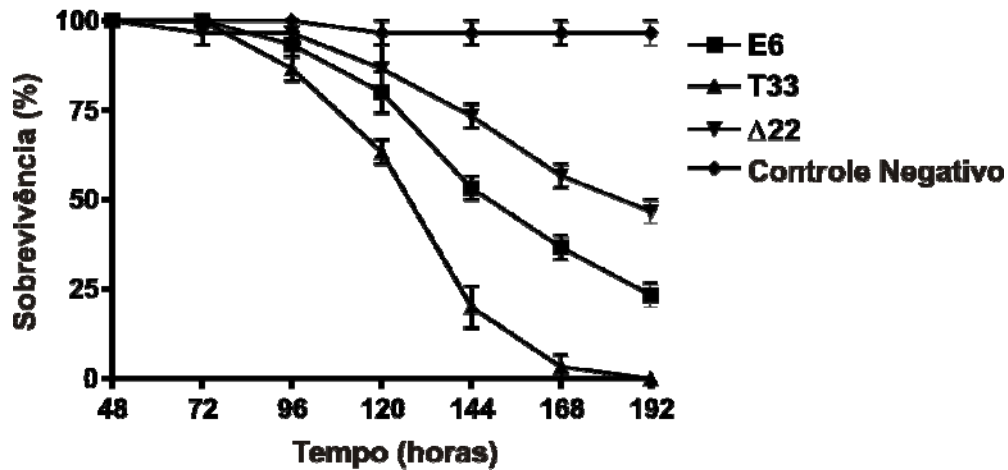
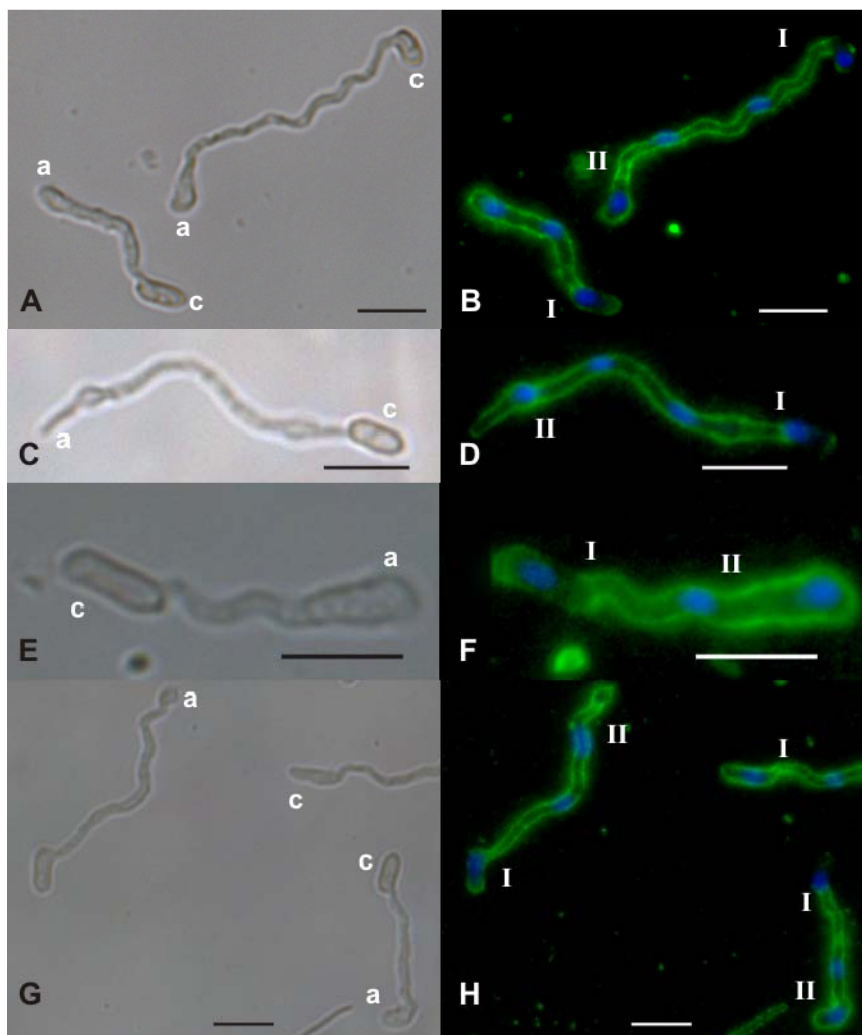


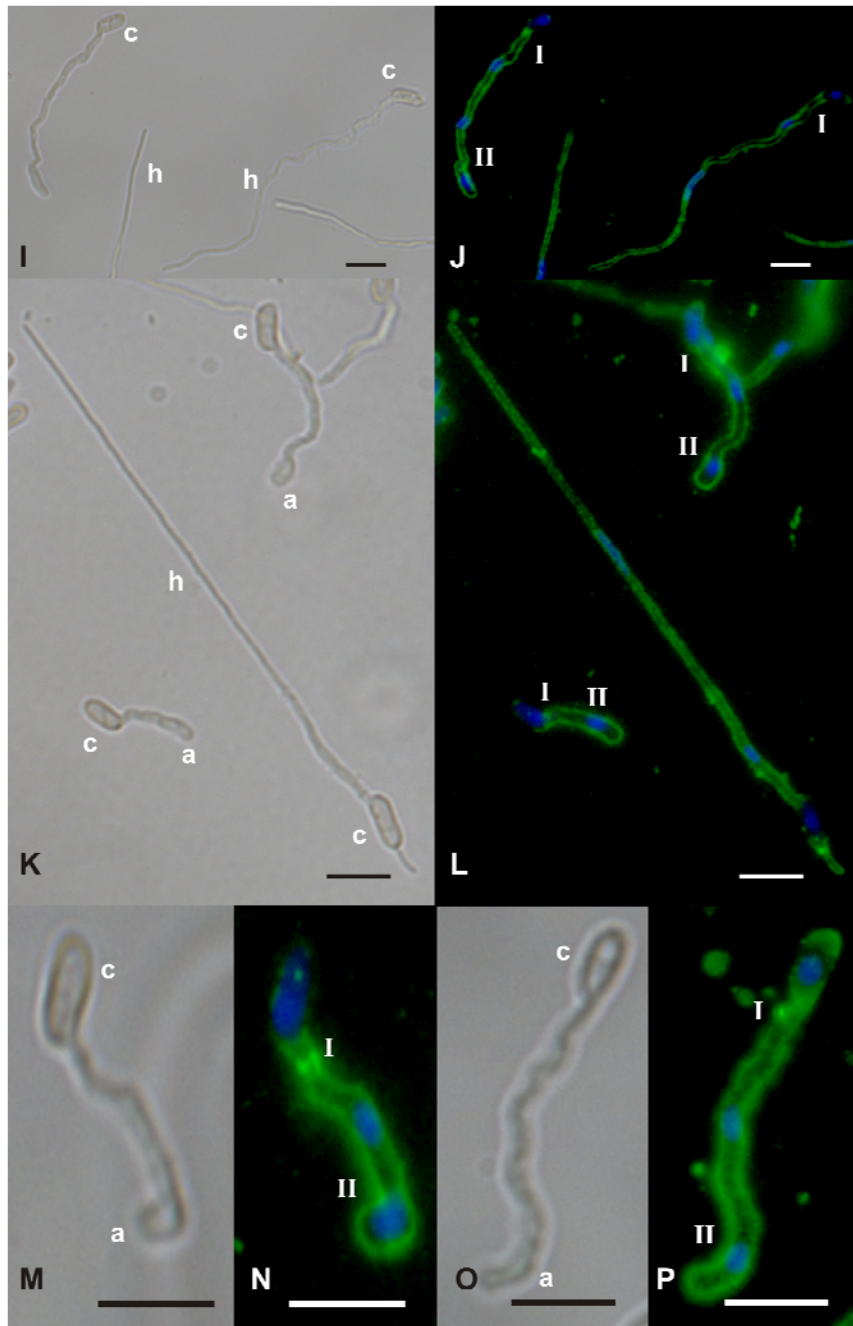
Figura 5.12: Mortalidade de *D. peruvianus* expostos à linhagem selvagem e aos transformantes T33 e Δ22 de *M. anisopliae*. Foram utilizados dez machos adultos do inseto manchador do algodão *D. peruvianus* por réplica, imersos por 10 segundos em suspensão de  $1 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup> de cada linhagem ou água destilada estéril (Controle Negativo). Cada uma das 3 réplicas biológicas tiveram 3 réplicas experimentais.

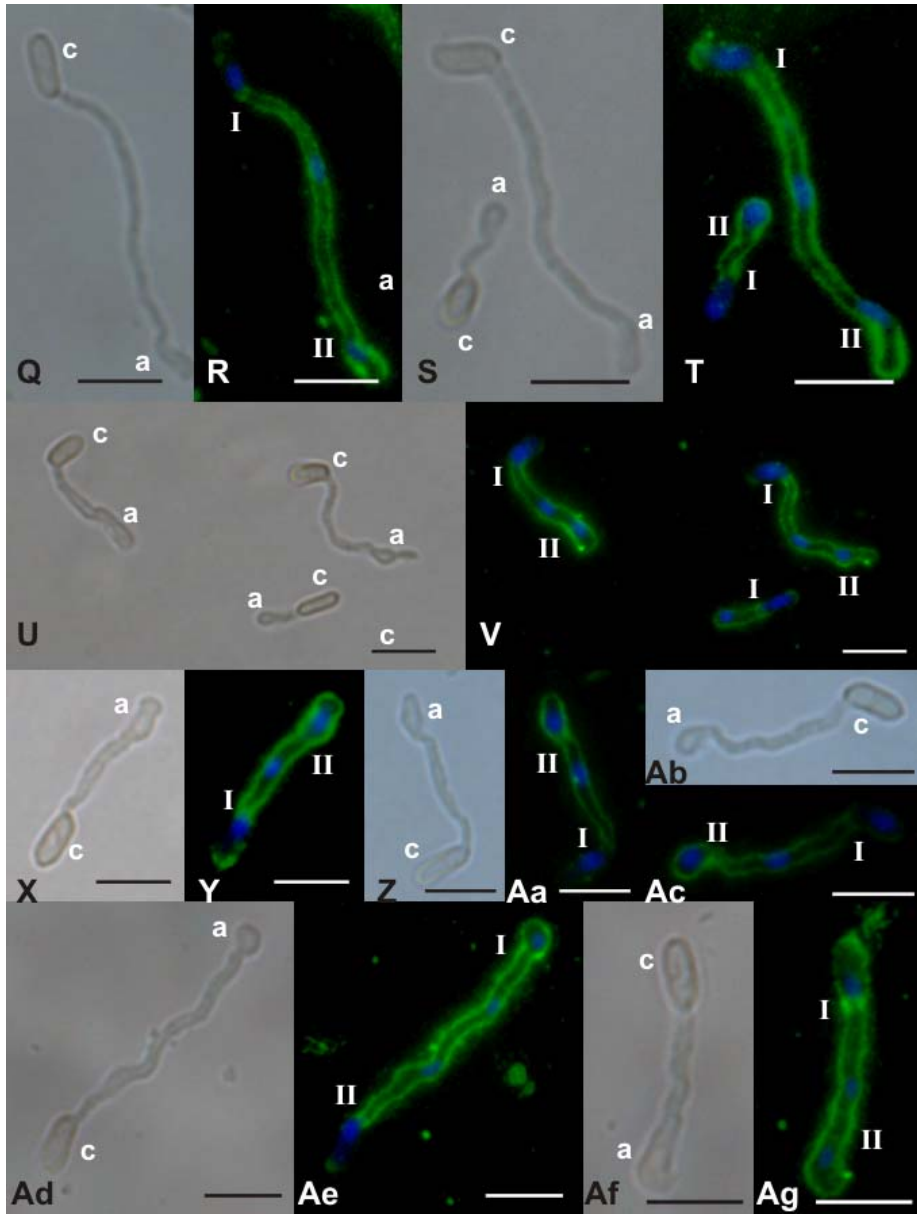
Conhecendo-se a natureza da proteína, a localização celular pode auxiliar na compreensão da sua função durante o desenvolvimento da célula e também permite identificar alterações morfológicas que porventura tenham ocorrido pela alteração artificial do padrão de expressão de certos genes. Por esta razão, realizamos ensaios de microscopia de imunofluorescência para evidenciarmos a citolocalização de CHI2 e apontar possíveis alterações morfológicas oriundas da superexpressão ou expressão nula desta quitinase (Fig. 5.13, 5.14 e 5.15).

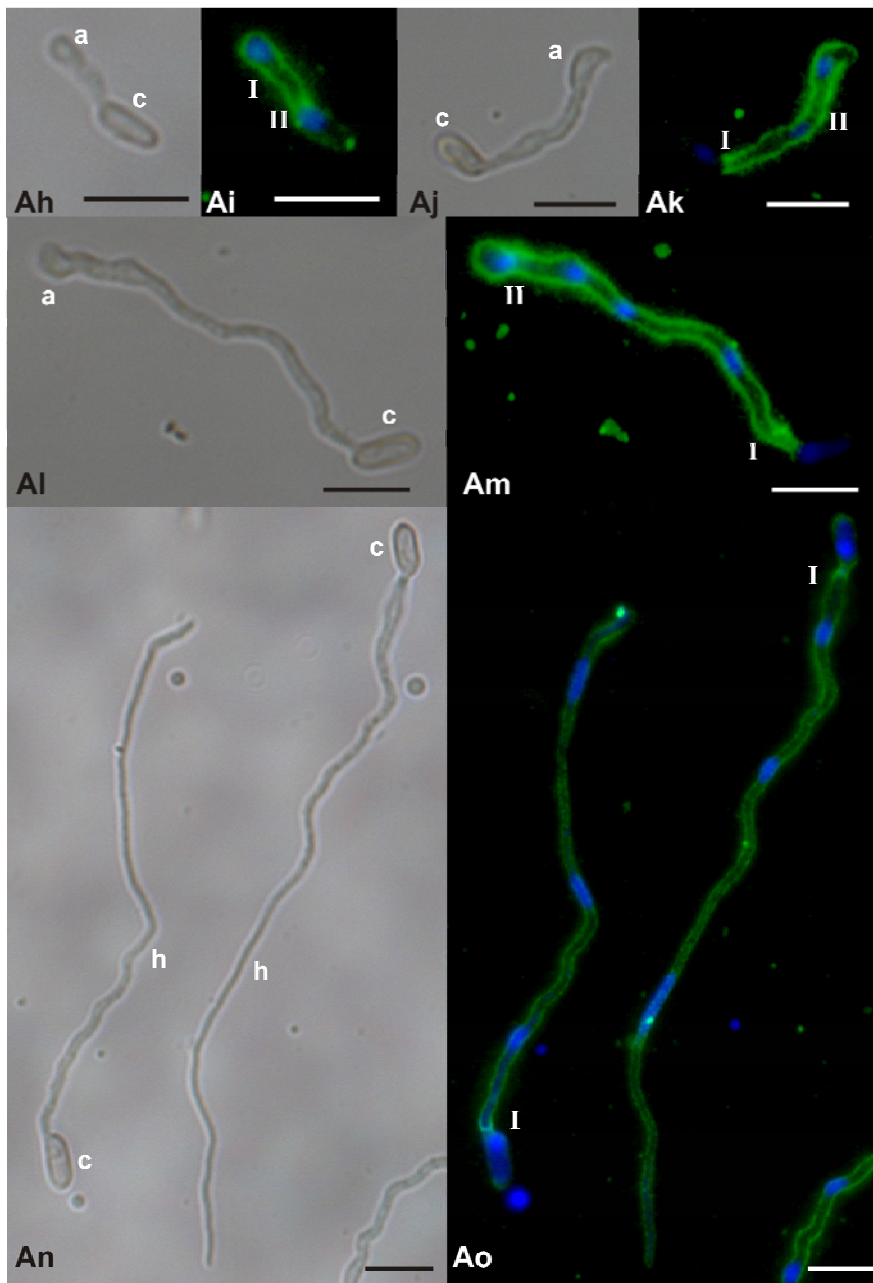
**Figura 5.13: Localização sub-celular da enzima CHI2 de *M. anisopliae* linhagem E6 utilizando antisoro-anti-CHI2. (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U, X, Z, Ab, Ad, Af, Ah, Aj, Al, An, Ap, Ar, At, Av, Ay, Ba, Bc, Be, Bg, Bi, Bk, Bm, Bo e Bq) campo claro, tempo de exposição de 300 ms. (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, U, Y, Aa, Ac, Ae, Ag, Ai, Ak, Am, Ao, Aq, As, Au, Ax, Az, Bb, Bd, Bf, Bh, Bj, Bl, Bn, Bp e Br) imunofluorescência (marcação utilizando antisoro primário anti-CHI2 e anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a FITC), tempo de exposição de 600 ms. Marcação de núcleo (DAPI), tempo de exposição, 100 ms. a – apressório; c – conídio; h – hifa; I – acúmulo de CHI2 na região de germinação do conídio; II – acúmulo de CHI2 na região de formação do apressório. A barra representa 10  $\mu$ m.**

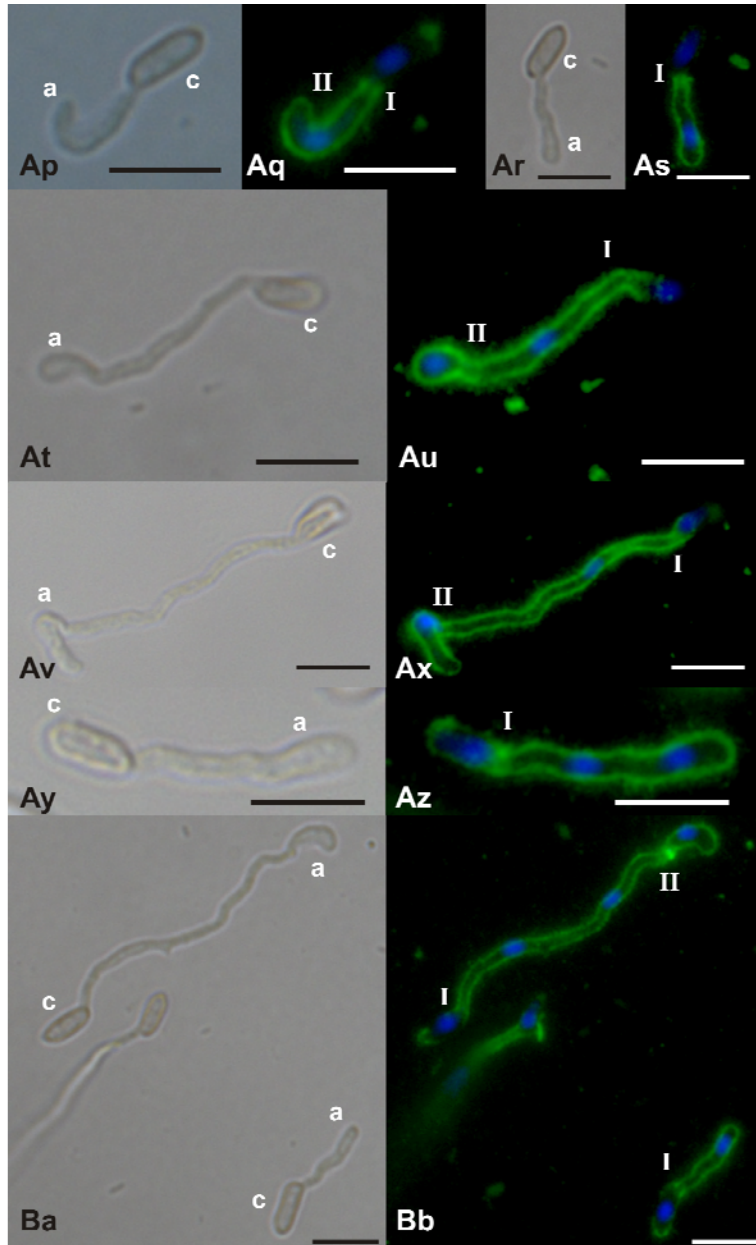


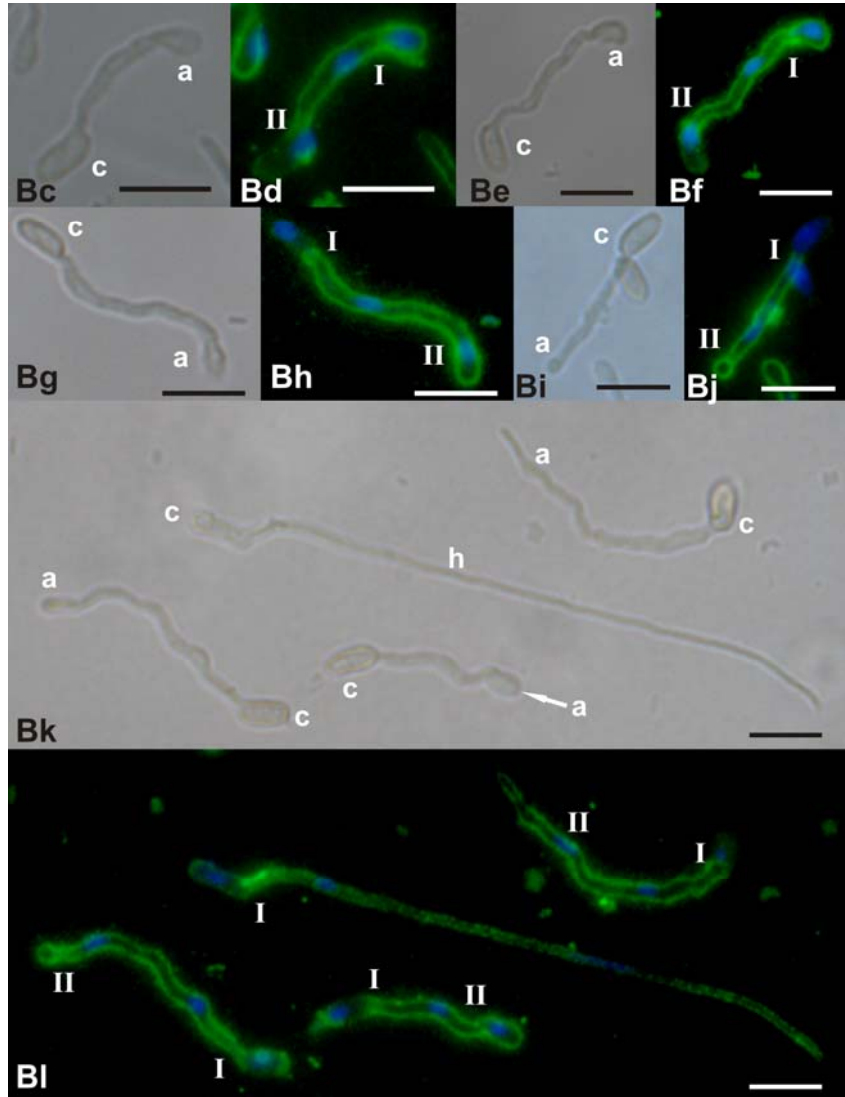


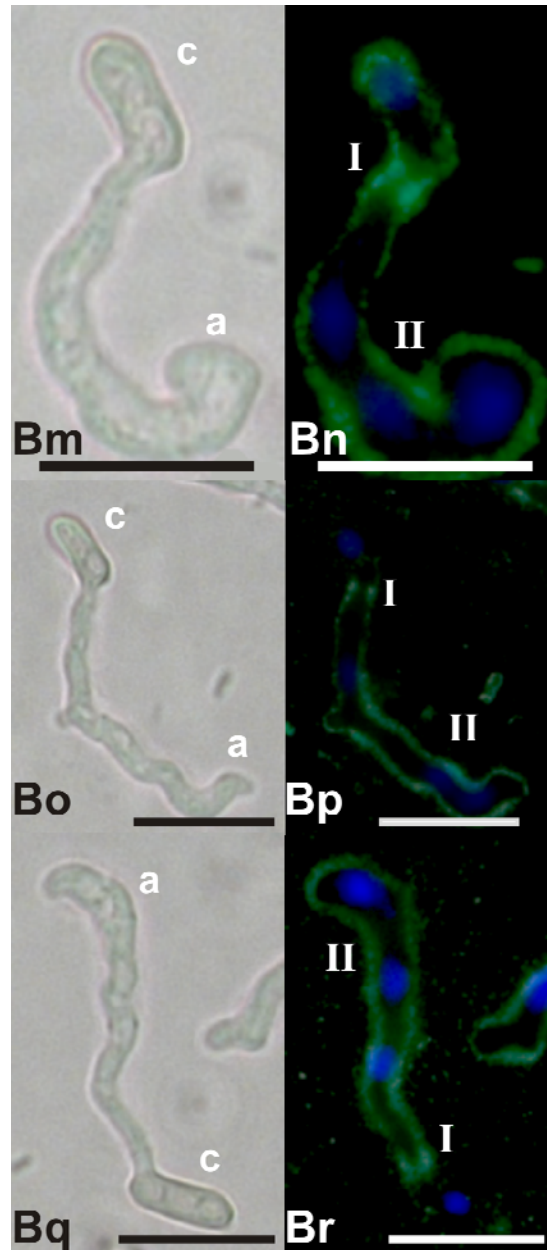




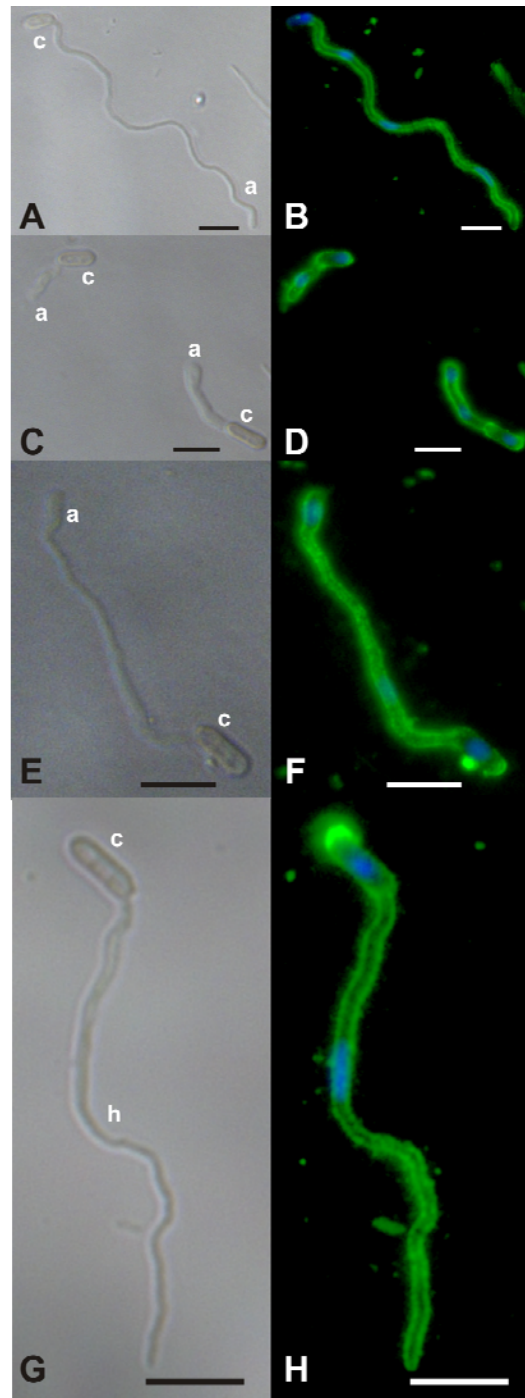




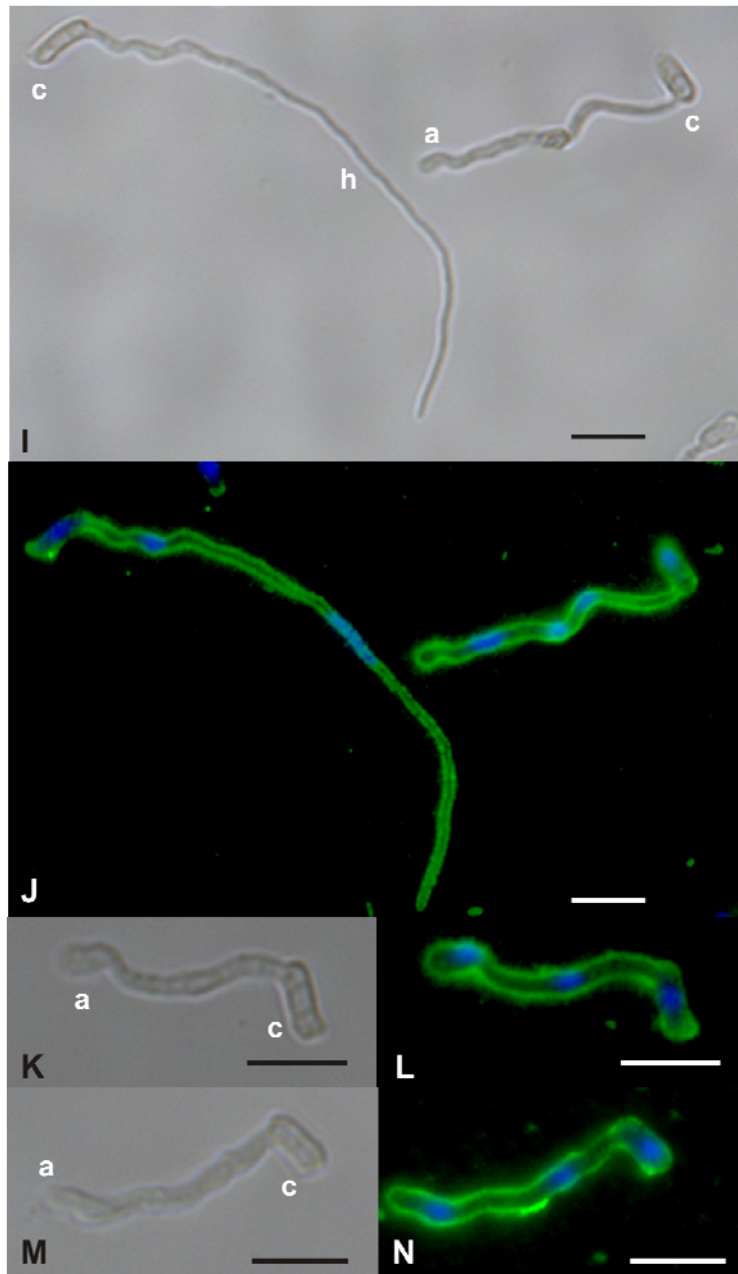


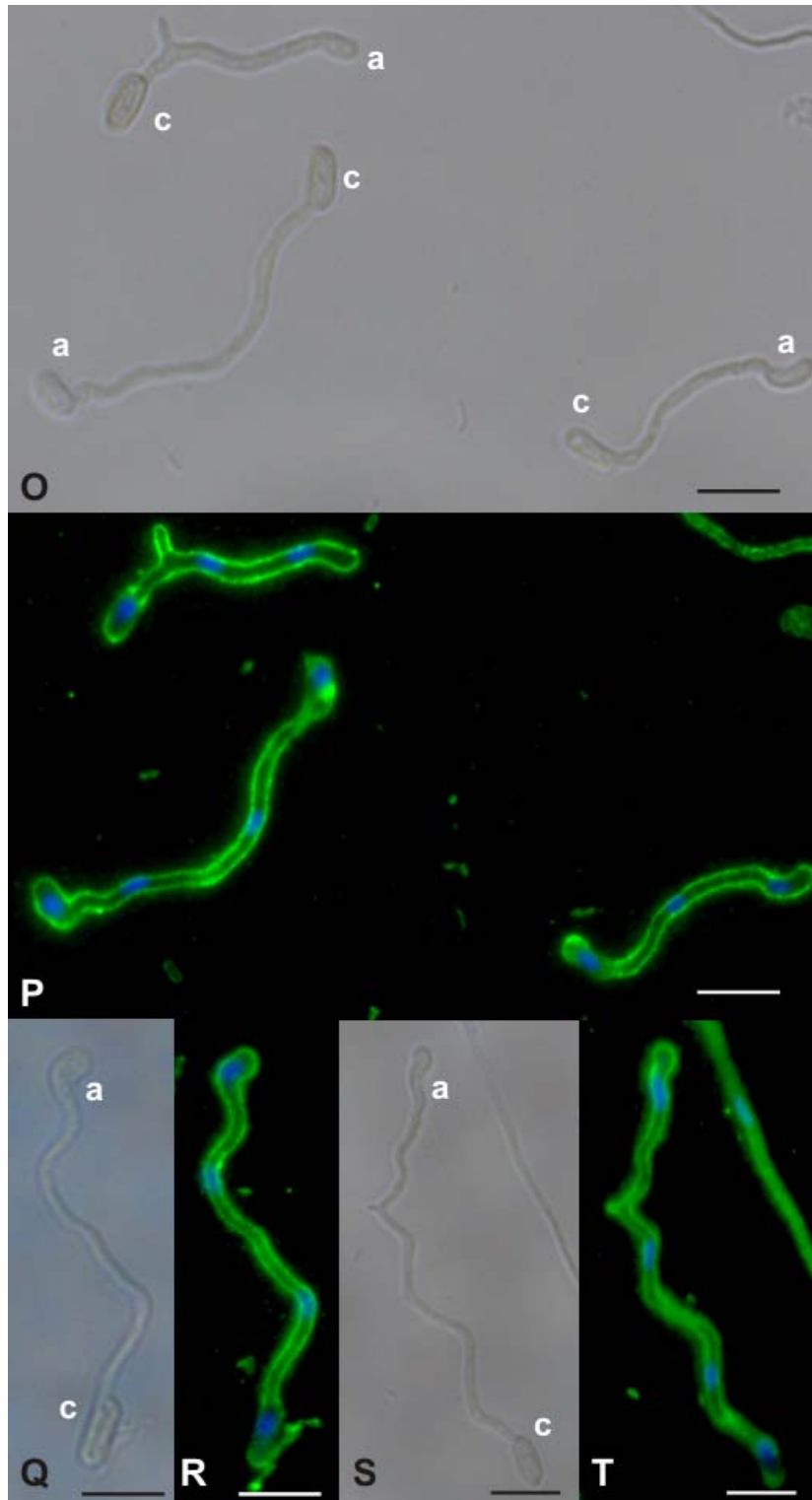


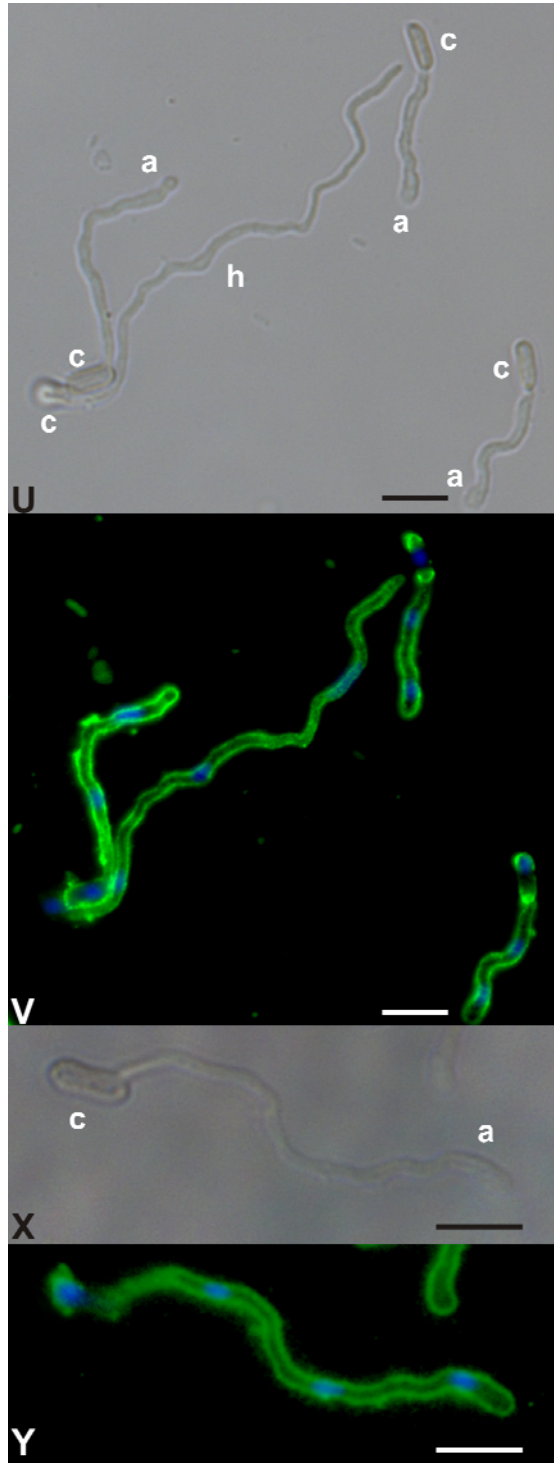
**Figura 5.14: Localização sub-celular da enzima CHI2 de *M. anisopliae* transformante T33 utilizando antisoro-anti-CHI2. (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U, X, Z, Ab, Ad, Af, Ah, Aj, Al, An e Ap) campo claro, tempo de exposição de 300 ms. (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, U, Y, Aa, Ac, Ae, Ag, Ai, Ak, Am, Ao e Aq) imunofluorescência (marcação utilizando antisoro primário anti-CHI2 e anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a FITC), tempo de exposição de 600 ms. Marcação de núcleo (DAPI), tempo de exposição, 100 ms. a – apressório; c – conídio; h – hifa. A barra representa 10  $\mu$ m.**

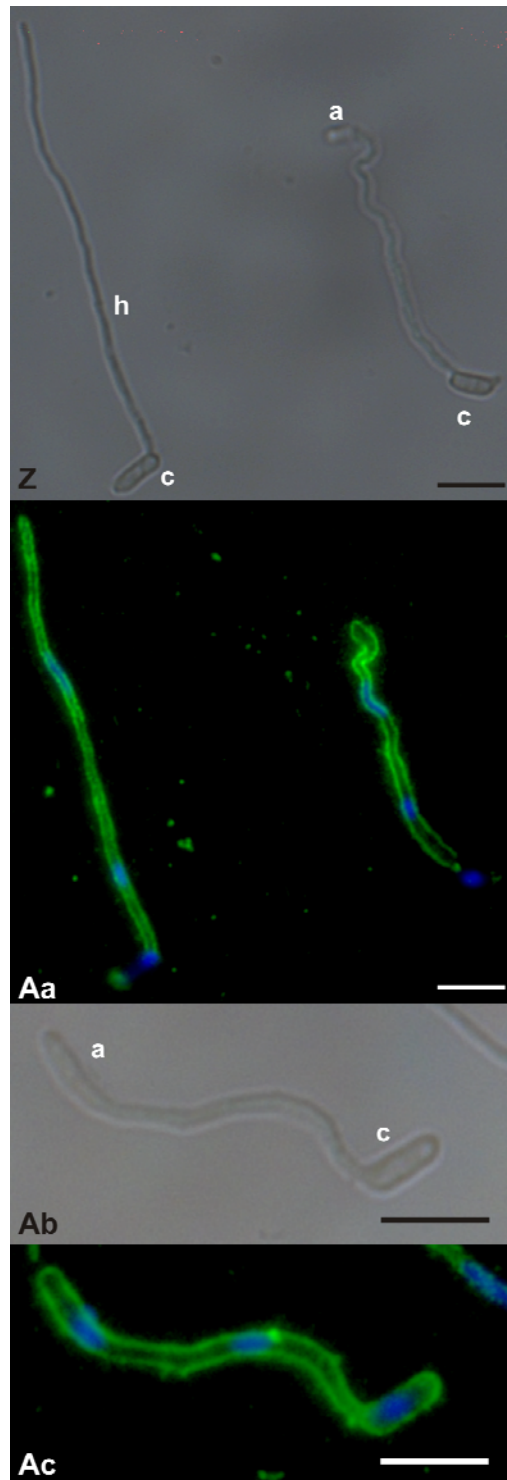


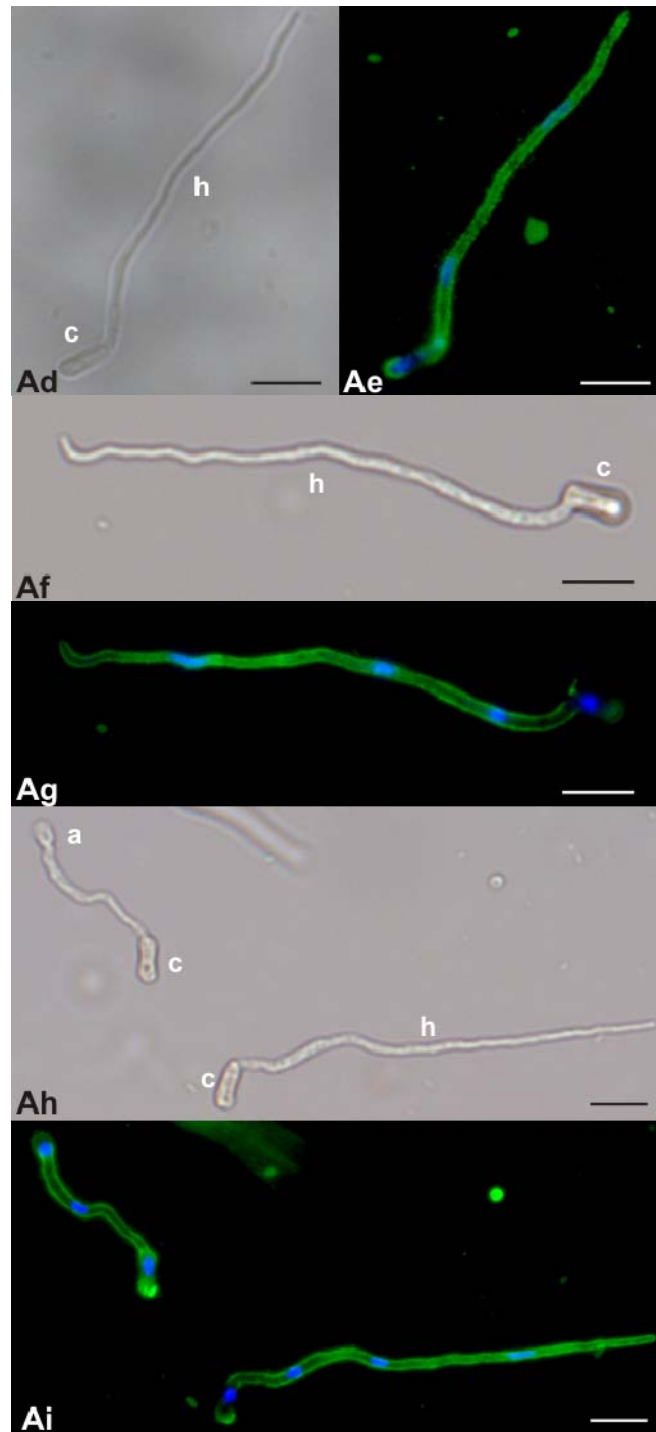


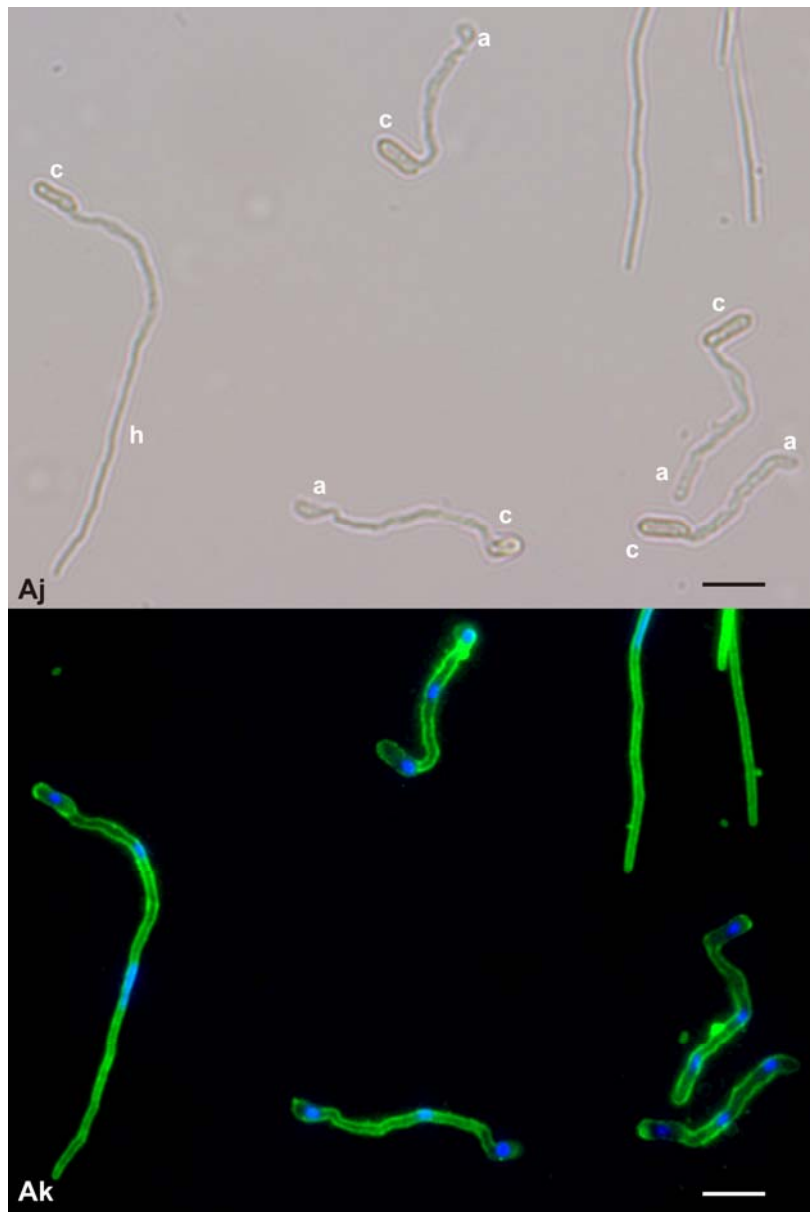


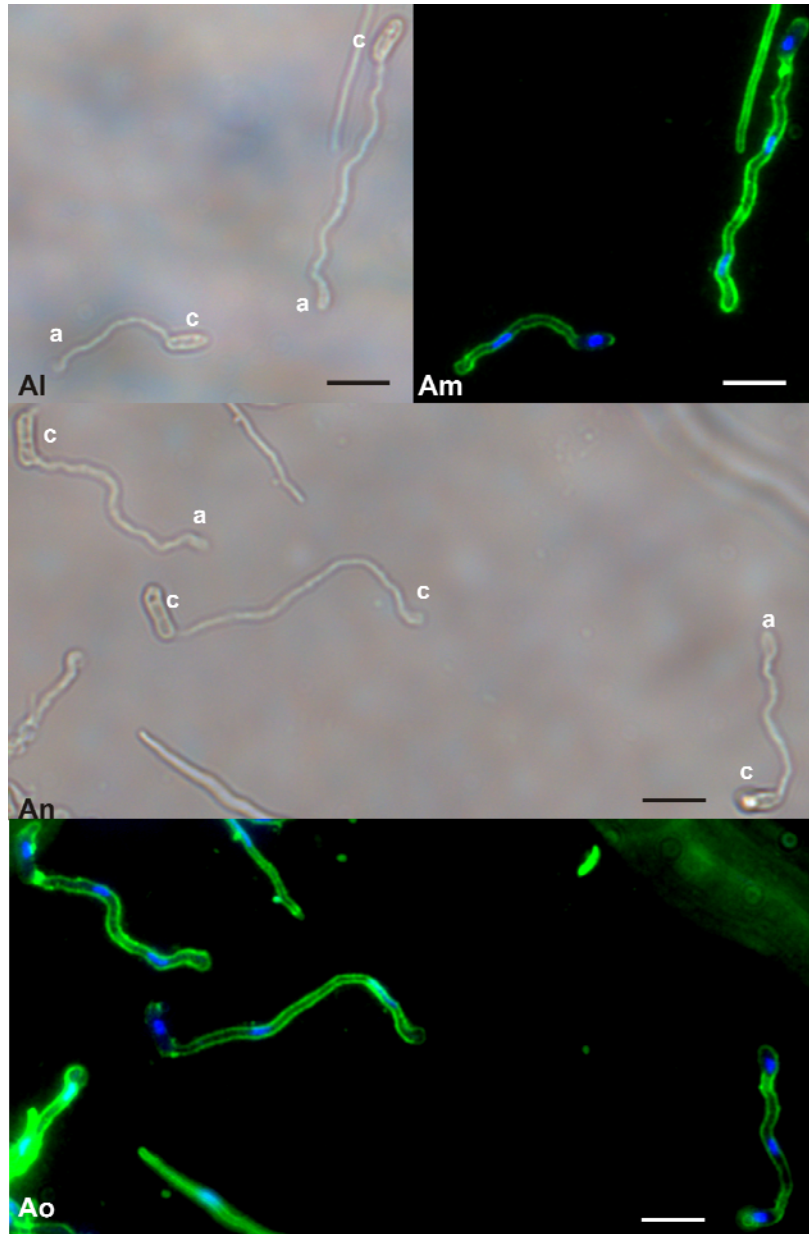


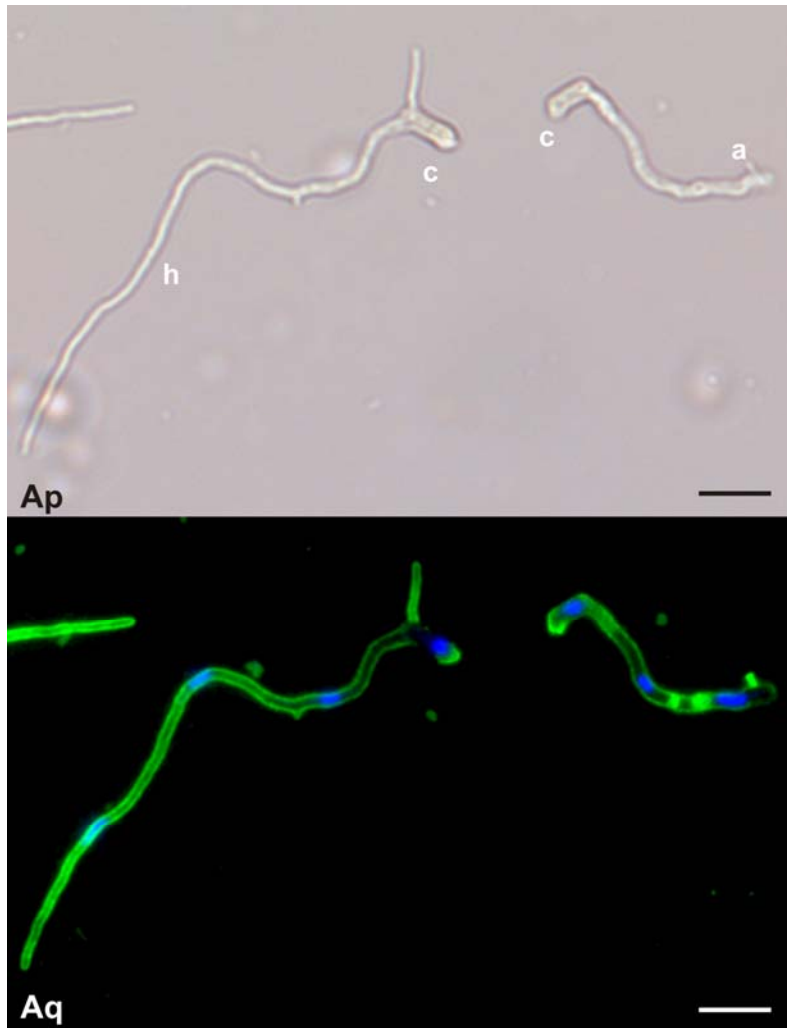






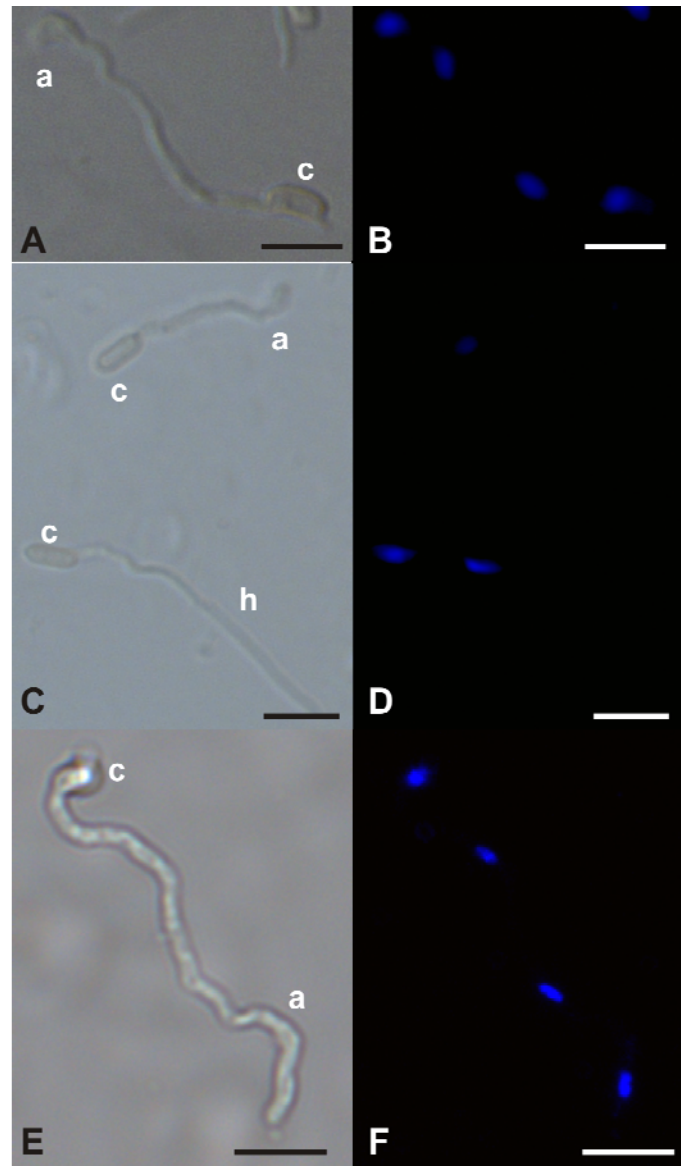


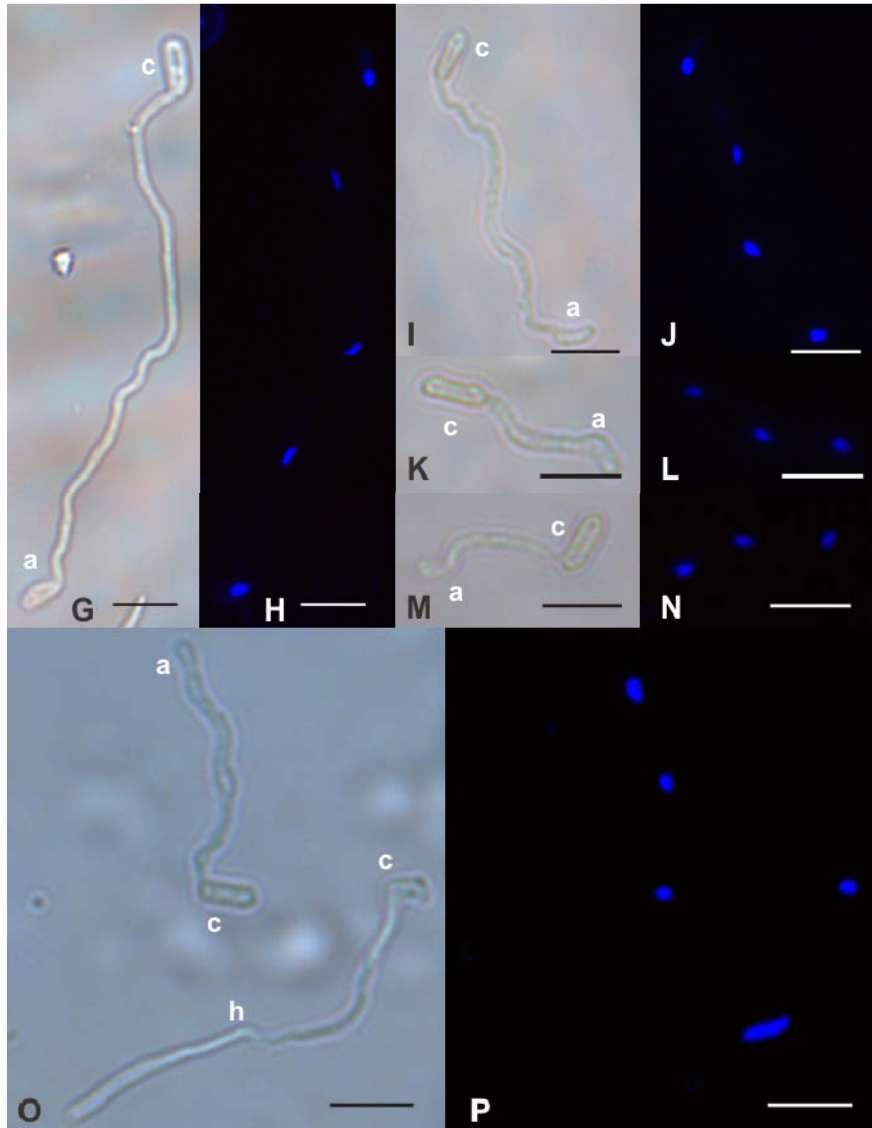






**Figura 5.15: Localização sub-celular da enzima CHI2 de *M. anisopliae* transformante  $\Delta 22$  utilizando antisoro-anti-CHI2. (A, C, E, G, I, K, M e O) campo claro, tempo de exposição de 300 ms. (B, D, F, H, J, L, N e P) imunofluorescência (marcação utilizando antisoro primário anti-CHI2 e anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a FITC), tempo de exposição de 600 ms. Marcação de núcleo (DAPI), tempo de exposição, 100 ms. a – apressório; c – conídio; h – hifa. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .**





Com os ensaios de microscopia de imunofluorescência, utilizando a linhagem selvagem de *M. anisopliae*, foi possível observar a presença da quitinase CHI2 junto à parede celular do fungo em hifas e em apressórios e a ausência na parede celular de conídios (Fig. 13). Ainda, pode-se observar padrões distintos na distribuição da enzima em conídios de onde germinam-se hifas ou tubos germinativos que, posteriormente, diferenciam-se em apressórios. Em hifas, além de estar presente na parede celular, CHI2 também encontra-se difusa no citoplasma. Há, também, regiões de acúmulo de CHI2 durante a germinação e formação de apressórios, referidos como I e II nas Figuras. Estas regiões sofrem intenso remodelamento da parede, necessitando a desestruturação das fibras de quitina para o crescimento e diferenciação (STEINBERG 2007). Por esta razão, quitinases fazem-se necessárias e é possível que a quitinase CHI2, além de ser secretada, auxilie na desestruturação da parede celular. A extremidade distal do apressório também é rica em CHI2 associada à parede celular, provavelmente em processo de liberação ao meio extracelular.

O padrão da localização de CHI2 nos transformantes superexpressando a enzima foi diferencialmente observado, não havendo regiões definidas de acúmulo. Porém, a distribuição difusa em hifas e a associação à parede celular em tubos germinativos e apressórios mantiveram-se semelhantes à linhagem E6. Outra diferença marcante na distribuição da enzima foi a sua presença na parede de conídios, fato não observado em E6. O transformante  $\Delta 22$  não apresentou fluorescência relacionada à expressão de CHI2.

## 6. Capítulo II - Estudo do processamento diferencial do gene *chi2*

### 6.1. Introdução

Com o advento do sequenciamento de moléculas de DNA foi possível analisar a complexidade dos genomas em um nível antes intangível. O conhecimento da seqüência em si e da organização de genomas dos mais diversos organismos permitiram, além de estudar aprofundadamente mecanismos de controle da expressão gênica e de *splicing* diferencial, estabelecer a correlação evolutiva entre estes organismos (BRETT *ET AL.*, 2002).

Porém, a enorme complexidade dos seres e o número de genes relativamente baixo trouxeram à tona uma questão inquietante: de onde viria a complexidade dos seres senão dos genes contidos em seus respectivos genomas? Uma das respostas seria o grande número de modificações pós-traducionais sofridas pelas proteínas. Somente em humanos, mais de 200 tipos de modificações já foram descritas, modulando a localização e função destas proteínas (BANKS *ET AL.*, 2000).

Outra fonte de complexidade seria o mecanismo de *splicing* alternativo, onde a retenção de íntrons ou remoção de éxons nos mais diversos padrões gerariam diferentes mRNAs e, conseqüentemente, diferentes proteínas a partir de um único gene (BRETT *ET AL.*, 2002). Este evento, já demonstrado experimentalmente, ocorre nos mais distintos organismos, sendo regulado por sinais químicos em diferentes tecidos ou fases de desenvolvimento, além de

características dos promotores dos genes (BRETT *ET AL.*, 2002; KORNBLIHTT 2005; SAMMETH *ET AL.*, 2008).

Além do *splicing* alternativo, o *splicing* alterado, é outro mecanismo para a geração de complexidade e foi amplamente descrito em fungos filamentosos, apesar de sua função biológica ainda não ser completamente compreendida (LARRONDO *ET AL.*, 2004; MACARENA *ET AL.*, 2005).

Em estudos avaliando a expressão do gene *chi2* em diferentes meios de cultivos, observou-se a presença de duas espécies de transcritos. Este padrão manteve-se e os diferentes transcritos foram seqüenciados. Identificamos, desta forma, a ocorrência de um processamento diferencial do *splicing* deste gene. Em diferentes condições, o segundo íntron, de 72 pb, é excisado ou não, gerando as duas espécies de transcrito. É a primeira vez que tal processamento é descrito em *M. anisopliae*. Posteriormente, também demonstramos a síntese de duas proteínas a partir destes transcritos.

Para comprovar o processamento diferencial do mRNA do gene *chi2*, estudos das duas espécies de transcritos e das prováveis proteínas geradas por *splicing* alterado são descritos e discutidos.

## 6.2. Material e Métodos

### 6.2.1. Soluções

#### 6.2.1.1. Gel Desnaturante de RNA

Agarose	- 1,5 % (m/V)
Formaldeído	- 5,5 % (V/V)
Tampão MOPS (item 6.2.1.)	- 1 x

Agarose foi fundida em água-DEPC (item 6.2.1.) apenas. Após, formaldeído e o tampão MOPS foram misturados em um frasco e mantidos a 65 °C. Após a agarose fundida atingir aproximadamente 65 °C, o formaldeído e o tampão MOPS foram adicionados. O gel foi vertido em forma previamente tratada com peróxido de hidrogênio 3 %.

#### 6.2.1.2. Água tratada com DEPC

DEPC	- 0,1 % (V/V)
------	---------------

DEPC foi adicionado em água ultra pura e Mantido por 16 h a 37 °C. Após, a água foi autoclavada.

**6.2.1.3. Tampão MOPS 10 x (SAMBROOK & RUSSEL 2001)**

MOPS	- 200 mM
Acetato de Sódio (NaCH <sub>3</sub> COO)	- 20 mM
EDTA	- 10 mM

MOPS foi dissolvido em água tratada com DEPC (item 6.2.1.). O pH foi ajustado para 7 com NaOH 2 N. Acetato de sódio e EDTA já em solução foram adicionados de modo a atingir a molaridade supracitada. A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente, protegida da luz.

**6.2.1.4. Tampão de pré-hibridização**

Formamida	- 50 % (m/V)
SDS	- 5 % (m/V)
SSPE (item 6.2.1.5)	- 5 x

Todos os reagentes foram misturados no momento do uso.



**6.2.1.5. SSPE 20 x**

Cloreto de Sódio (NaCl)	- 17,53 % (m/V)
Fosfato de Sódio Monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	- 2,76 % (m/V)
EDTA	- 0,94 % (m/V)

Os reagentes foram adicionados em água ultra pura e o pH foi ajustado para 7.4 utilizando NaOH. A solução foi esterilizada por autoclavagem.

**6.2.1.6. Corante de Ponceau S 0,5 %**

Ponceau S	- 0,5 % (m/V)
Ácido Acético Glacial	- 1 % (V/V)

Todos os reagentes foram solubilizados em água e armazenados a 4 °C.

**6.2.1.7. TBS/Tween-20 20 x**

Tris Base	- 20 mM
Cloreto de Sódio	- 137 mM
Tween-20	- 1 % (V/V)

Todos os reagentes foram adicionados em água e o pH foi ajustado para 7,6 utilizando HCl.

**6.2.1.8. Tampão de bloqueio**

Leite Desnatado em Pó - 5 % (m/V)

O reagente foi solubilizado em TBS/Tween-20 1 x no momento do uso.

**6.2.1.9. Solução de acetonitrila 50 % e bicarbonato de amônio 50 mM**

Bicarbonato de amônio - 50 mM

Acetonitrila - q. s. p. 50 %

Bicarbonato de amônio foi solubilizado em água Milli-Q e esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Após, adicionou-se acetonitrila 100% 1:1.

**6.2.1.10. Solução de bicarbonato de amônio 25 mM**

Bicarbonato de amônio - 25 mM

O reagente foi solubilizado em água Milli-Q e esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 6.2.1.11. Solução de acetonitrila:ácido trifluoroacético 1:1

Acetonitrila	- q. s. p. 50 %
Ácido trifluoroacético	- q. s. p. 50 %

Os reagentes foram misturados no momento do uso tendo água como solvente.

#### 6.2.2. Análise por RT-PCR

A linhagem E6 de *M. anisopliae* foi crescida em meio líquido (MM; item 5.2.1.20) contendo quitina cristalina 1% (m/V) por 24, 32, 40, 48, 56, 72, 96 e 120 h a 28 °C e 150 RPM. O micélio foi filtrado e RNA total foi extraído conforme item 5.2.7. As amostras foram tratadas com 1 U/μg de RNA total de DNase livre de RNase e um ensaio de PCR foi realizado para atestar-se a ausência de DNA genômico. A partir destas amostras, cDNA foi sintetizado. Os cDNAs referentes ao gene *chi2* e ao gene controle *tub* ( $\beta$ -tubulina) foram amplificados utilizando *primers* específicos (Tabela 4). Os *primers* específicos para o gene *chi2* flanqueiam o íntron de 72 pb. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador PTC-200 (MJ Research) de acordo com o seguinte protocolo: 95 °C por 5 min; 95 °C por 1 min, 60 °C por 45 s, 72 °C por 50 s (26 ciclos); 72 °C por 5 min. Após a amplificação, as amostras foram eletroforéticamente separadas em gel de agarose 1,5% (m/V), visualizadas em um transiluminador UV padrão e os resultados foram registrados digitalmente.

### 6.2.3. Análise por *Northern blot*

*M. anisopliae* foi crescido em meio líquido contendo quitina cristalina 1% (m/V), glicose 1% (m/V), GlcNAc 1% (m/V) ou 0,25% (m/V) como únicas fontes de carbono. Após 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação a 28 °C e 150 RPM, o micélio foi filtrado e RNA total foi extraído conforme item 5.2.7. A análise de *Northern blot* foi realizada conforme item 5.2.10.

### 6.2.4. Marcação de sonda utilizando fósforo radioativo (P<sup>32</sup>)

A marcação das sondas foi realizada conforme item 5.2.11.

### 6.2.5. Análise por PCR em tempo real (qPCR)

Alíquotas das amostras de RNA total extraídas para os ensaios de *Northern blot* foram tratadas com 1 U.µg de RNA total<sup>-1</sup> de DNase livre de RNase. Um experimento de PCR foi realizado para atestar a ausência de DNA genômico e cDNA foi sintetizado. As amostras, previamente normalizadas, foram submetidas à qPCR utilizando *primers* específicos para os genes *chi2*, *tub* e *gapdh* (gliceraldeído-3-fostado desidrogenase). De acordo com os resultados dos ensaios de *Northern blot*, o gene *tub* foi selecionado como gene referência. Além do gene *tub*, a forma totalmente processada do gene *chi2* foi utilizada como referência para determinar as diferenças de expressão entre as duas espécies de transcrito nas condições avaliadas. A reação de qPCR foi feita utilizando o kit *Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). A análise dos resultados foi realizada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e a

diferença estatística entre os resultados foi determinada utilizando o teste *t* de Student ( $p < 0,001$ ).

#### 6.2.6. Análises por *Western blot* bidimensional

*M. anisopliae* foi cultivado em meio líquido (MM) contendo quitina cristalina 1% (m/V) por 96 h a 28 °C e 150 RPM. O micélio foi filtrado e o sobrenadante foi liofilizado e ressuspenso em água Milli-Q a 1/10 do volume inicial. Aproximadamente 2 mg de proteína total foram precipitadas utilizando ácido tricloroacético 30% (m/V) por 16 h a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 15 min, lavadas com acetona absoluta 5 vezes, secas em temperatura ambiente e solubilizadas em tampão de isoeletrofocalização (uréia 7 M, tio-uréia 2 M, CHAPS 4% (p/V), ditiotreitól (DTT) 1% (p/V) e anfólitos pH 3-10 0,2% (V/V)). As proteínas foram separadas de acordo com seus pontos isoelétricos em tiras IPG de 17 cm com valores de pH de 4 a 7 (Bio-Rad) utilizando o isoeletrofocalizador *PROTEAN IEF Cell* (Bio Rad) até 70.000 v.h acumulados a uma voltagem máxima de 10.000 v. As tiras foram equilibradas por 15 min em tampão de equilíbrio I (glicerol 30% (V/V), uréia 6 M, DTT 1%, traço de Azul de Bromofenol) e por 15 min em tampão de equilíbrio II (tampão de equilíbrio I com iodoacetamida 4% substituindo DTT). As tiras foram submetidas a SDS-PAGE e eletrotransferidas a membranas de PVDF por 16 h a 100 V em tampão apropriado (item 6.2.1) após tratamento das membranas com metanol absoluto. As membranas foram coradas com corante de Ponceau (item 6.2.1.7) diluído em TBS/Tween-20 1 x (item 6.2.1.8) para confirmar a transferência. O corante foi removido com sucessivas lavagens de TBS/Tween-20 1 x. As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio

(item 6.2.1.9) por 2 h em temperatura ambiente com agitação. Após, os anticorpos contra CHI2 (diluídos a 1:1.000 em tampão de bloqueio [item 6.2.1.9]) foram incubados por 1 h em temperatura ambiente com agitação. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS/Tween-20 1 x e incubada 1 h em temperatura ambiente com os anticorpos secundários (anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase – Sigma; diluídos a 1:2.000 em tampão de bloqueio [item 6.2.1.9]). Os sinais de reconhecimento foram gerados utilizando o kit *ECL Plus* (GE Healthcare) e o sinal digital foi obtido utilizando o sistema *Pharos* (Bio-Rad).

#### **6.2.7. Digestão com Tripsina em Gel e Espectrometria de Massas**

Os *spots* de proteínas foram removidos manualmente de géis corados com *Coomassie blue* e as proteínas foram digeridas em gel com tripsina. Os fragmentos de gel foram tratados com três passos de lavagem com 180  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetonitrila 50 % e bicarbonato de amônio 50 mM (item 6.2.1.10) por 15 min, seguidas de uma lavagem com 180  $\mu\text{L}$  de acetonitrila PA. Após as lavagens, os fragmentos de gel foram secos por centrifugação a vácuo e as proteínas digeridas por 18-24 h a 37 °C utilizando 12  $\mu\text{L}$  de tripsina modificada a 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (tripsina modifica grau de sequenciamento, Promega) diluída em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM (item 6.2.11). Após a digestão trípica, os peptídeos foram extraídos em duas lavagens de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetonitrila e ácido trifluoroacético (TFA) 1:1 (item 6.2.1.12) por 1 h. Os peptídeos extraídos foram secos e ressuspensos em 10  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q.

Análises de MS/MS foram realizadas em um espectrômetro de massas Ultima API (Micromass) de ionização por *eletrospray* (ESI) tempo-de-vôo quadrupolo (Q-TOF) acoplado a um sistema de cromatografia líquida capilar de nano-fluxo (UPLC). Uma fonte ESI nano-fluxo foi utilizada junto a uma fonte *spray* para mensuração da massa de calibração (*lockmass*) durante todas as corridas cromatográficas. Os dados foram adquiridos em um modo dependente de dados (DDA), e peptídeos ionizados com múltiplas cargas (+2 e +3) foram automaticamente selecionados de acordo com a massa e dissociados em experimentos de MS/MS. Condições ideais de LC e ESI foram fluxo de 300 nL.min<sup>-1</sup>, voltagem do capilar de nano-fluxo de 3,5 kV, temperatura do bloco 100 °C e voltagem do cone de 50 V.

Os espectros de MS/MS foram processados utilizando o software Proteinlynx v. 2,0 (Waters) e os arquivos de PKL gerados foram utilizados para realizar buscas em bancos de dados através do software PEAKS Studio v. 4,5 (Bioinformatics Solutions) contra o banco de dados não-redundante do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e bancos de dados locais contendo a proteína CHI2 predita a partir dos transcritos do gene *chi2*. Parâmetros de busca permitiram o máximo de uma clivagem não realizada, a carbamidometilação das cisteínas, a possível oxidação da metionina, tolerância de peptídeo de 0,2 Da e tolerância de MS/MS de 0,2 Da. O limite de significância foi definido a  $p < 0,05$  e a identificação só foi validada se cada proteína possuísse pelo menos um peptídeo com um valor esperado  $< 0,05$ .

### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. Geração de dois transcritos a partir do gene *chi2*

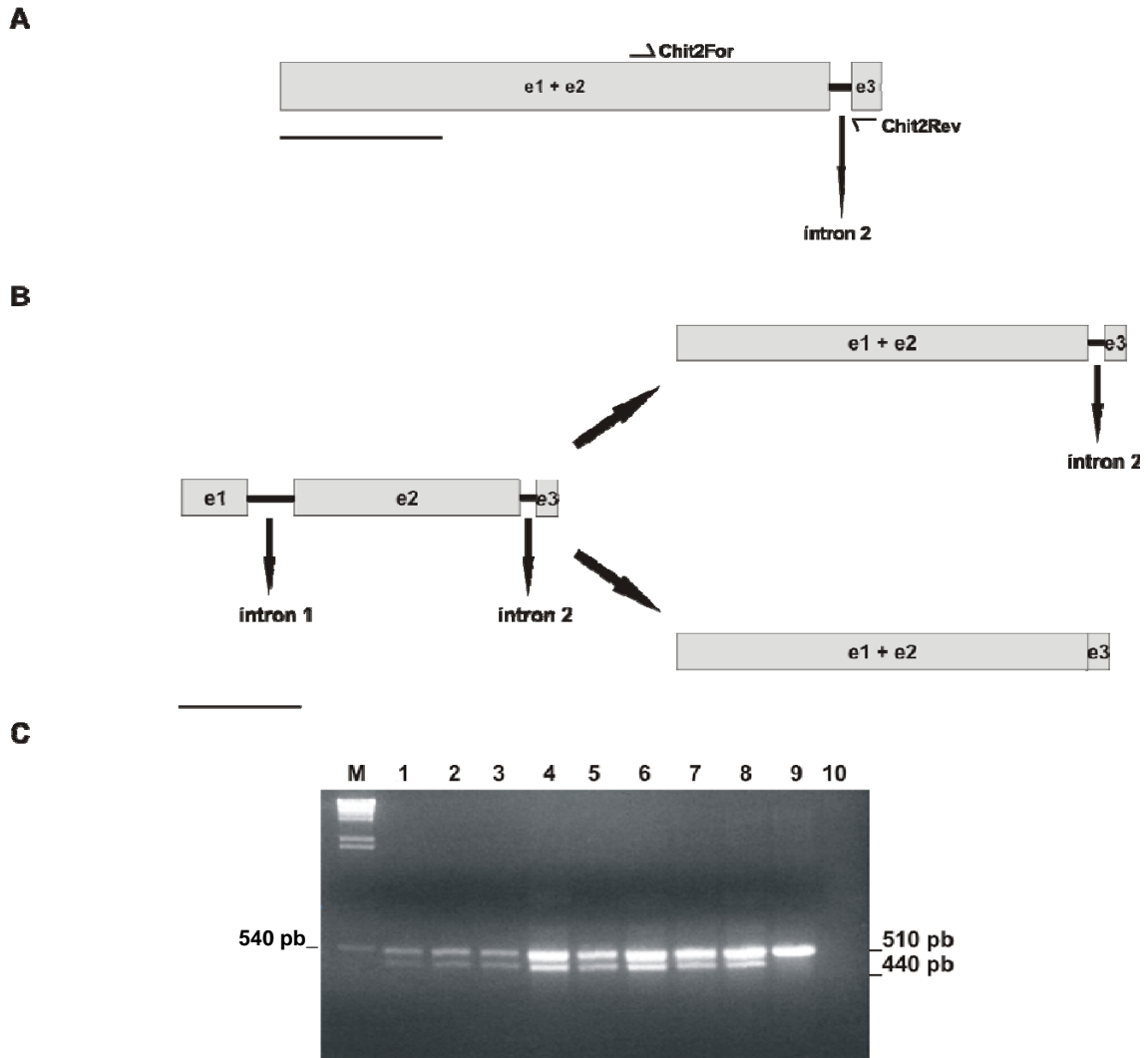
Estudando a regulação do gene *chi2* observamos a geração de dois transcritos oriundos deste gene. Para melhor avaliar a ocorrência de tal fenômeno, ensaios de RT-PCR, *Northern blot* e qRT-PCR foram realizados.

Os experimentos de RT-PCR mostraram a presença de dois transcritos em todas as condições testadas (item 6.2.2; Fig. 6.1). Ambos transcritos foram seqüenciados, demonstrando a presença de um transcrito parcialmente e outro totalmente processado (Fig. 6.2).

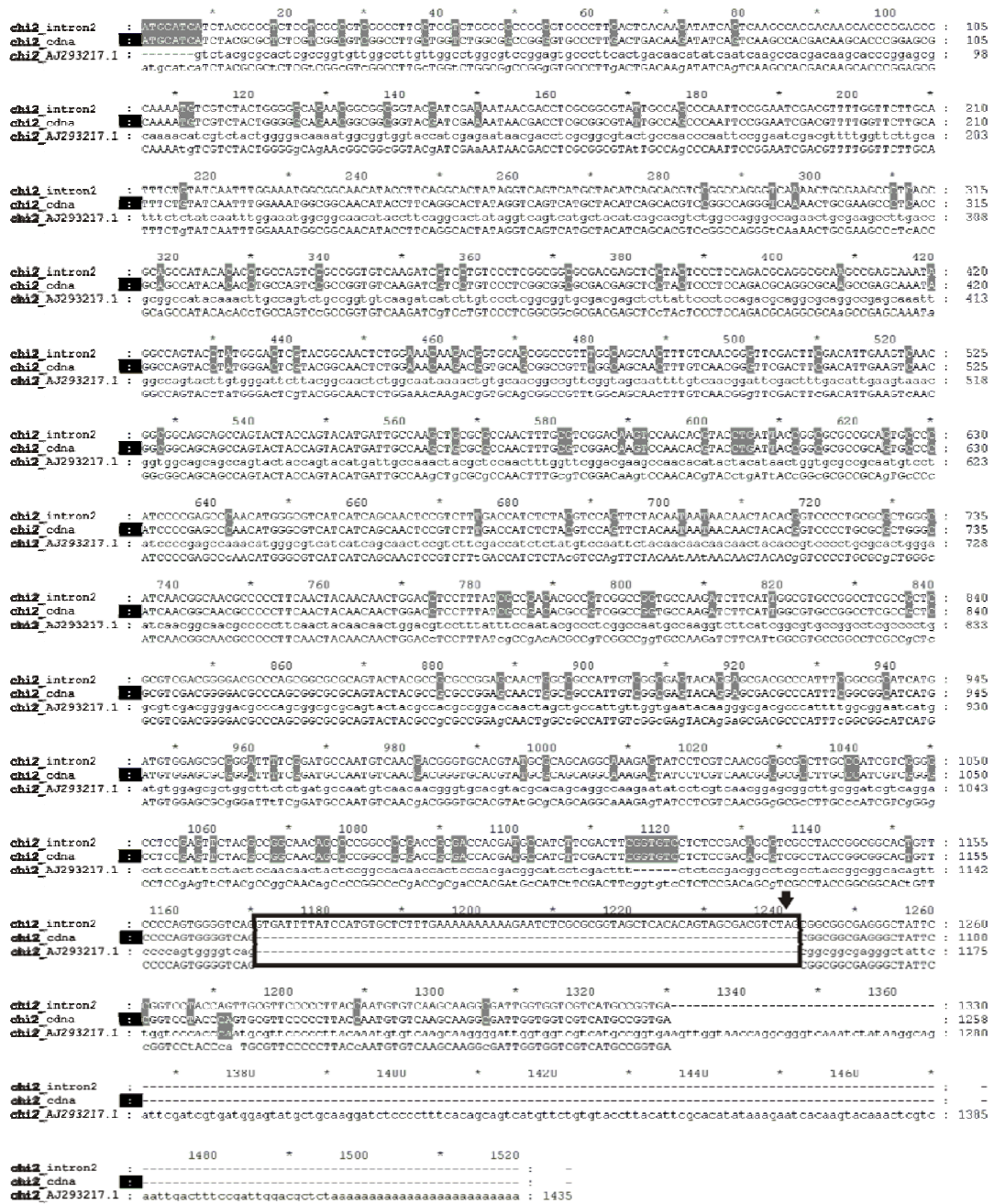
Para confirmar os resultados obtidos em ensaios de RT-PCR, conduzimos experimentos de *Northern blot*. Em todas as condições avaliadas (item 6.2.3) onde o gene *chi2* é expresso foi observada a presença de dois transcritos (Fig. 6.3).

Como observado nos ensaios de *Northern blot* (Fig. 6.3), existem diferentes níveis de expressão das diferentes formas de transcrito. Para avaliarmos as diferenças de expressão dos transcritos, procedemos para ensaios de qRT-PCR tanto do gene *chi2*, comparado com a expressão de um gene constitutivo para as condições avaliadas (gene *tub*) e comparando a expressão entre os transcritos (Fig. 6.4).

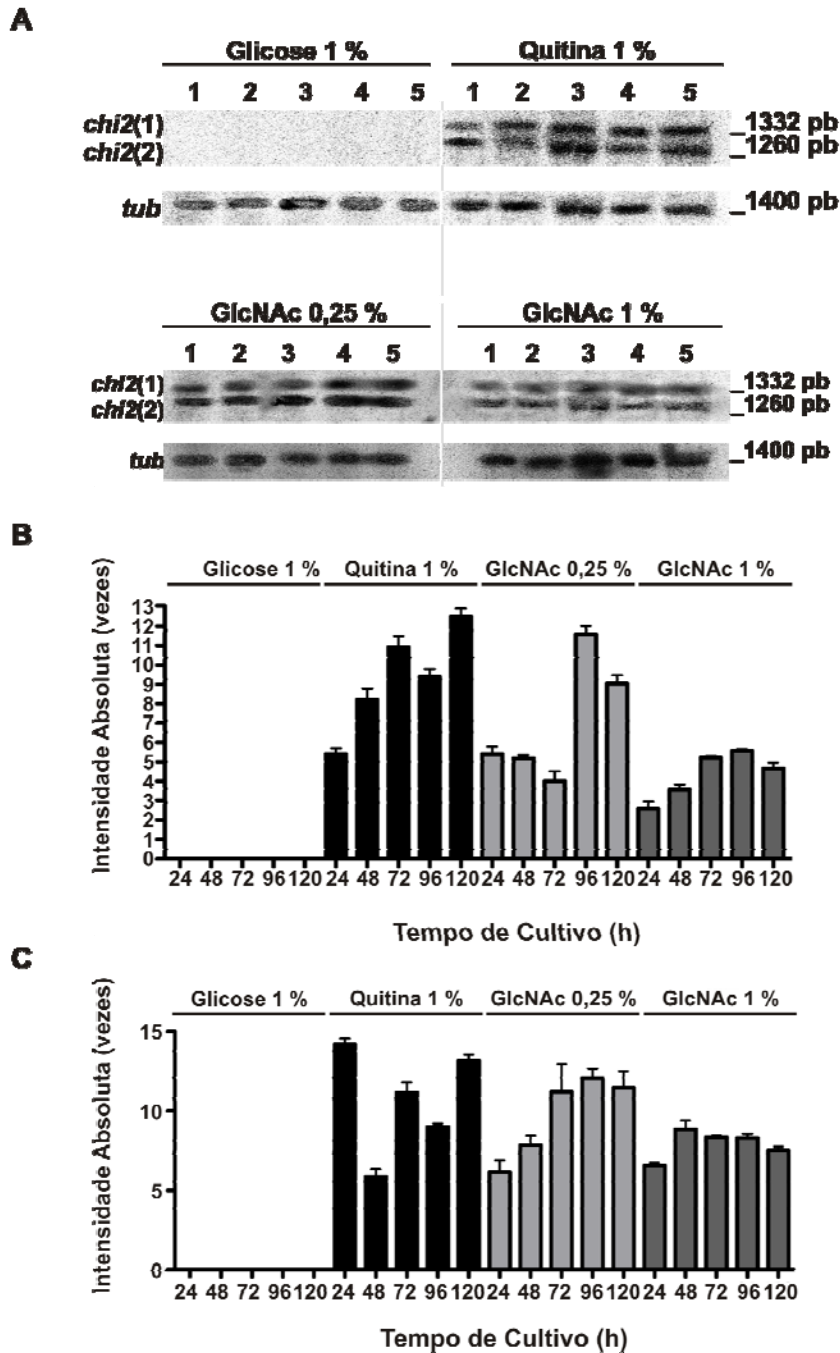




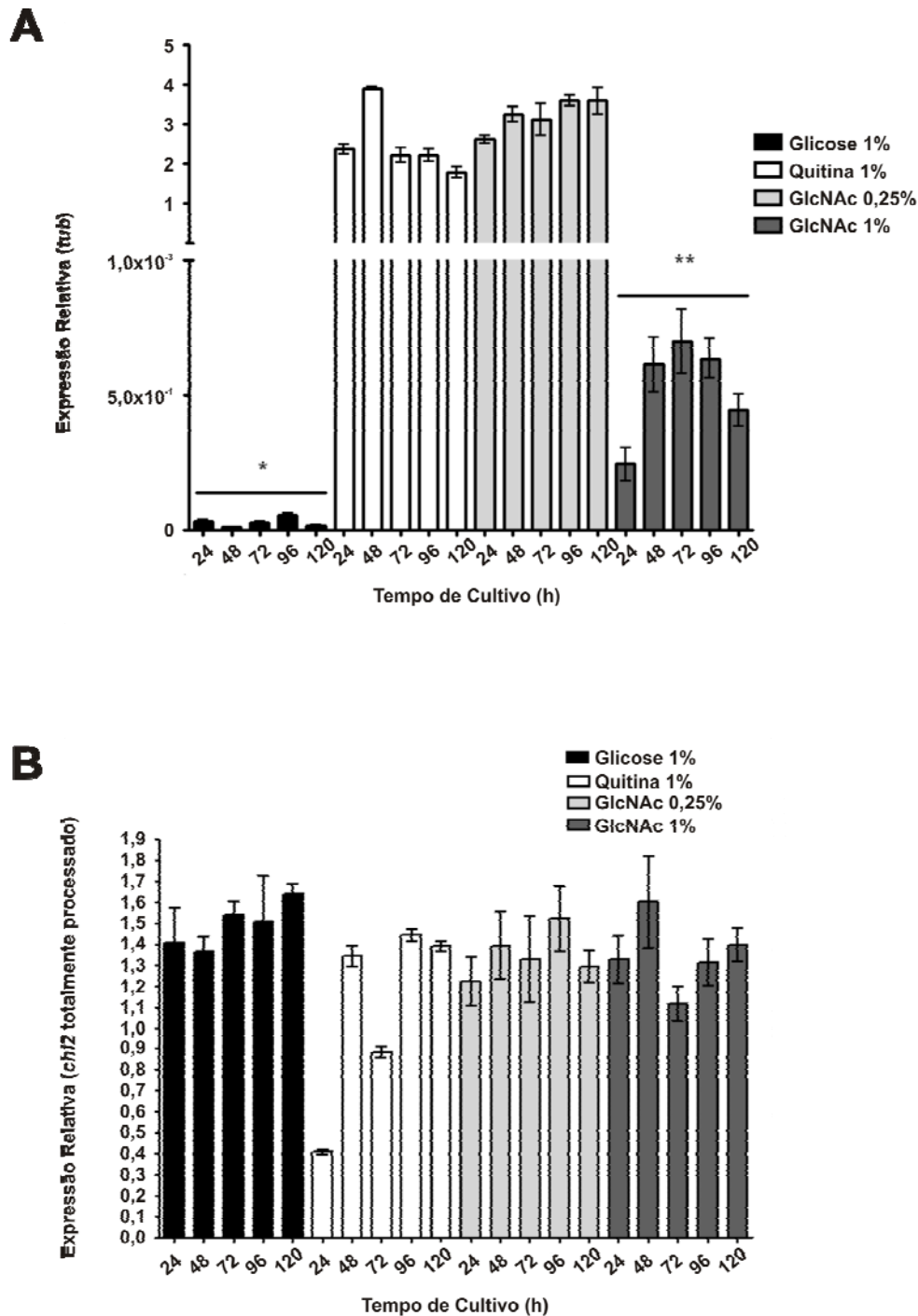
**Figura 6.1: Geração de dois transcritos a partir do gene *chi2*.** **A.** Região do anelamento dos *primers* Chit2For e Chit2Rev (Tabela 4). **B.** Figura esquemática demonstrando a provável síntese de dois transcritos. **C.** RT-PCR demonstrando a síntese de dois transcritos a partir do gene *chi2*. (M)  $\lambda$ /HindIII. As canaletas indicam a amplificação das duas espécies de transcritos de *chi2* amplificadas a partir de cDNA gerado de mRNA extraído em (1) 24, (2) 32, (3) 40, (4) 48, (5) 56, (6) 72, (7) 96, e (8) 120 h de cultivo; (9) controle positivo (DNA genômico de E6); (10) controle negativo sem DNA molde. As barras localizadas abaixo dos esquemas representam 500 pb.



**Figura 6.2:** A comparação das seqüências das duas espécies de mRNA demonstra a retenção do segundo íntron. Alinhamento de seqüências obtidas a partir de clones de cDNA do gene *chi2* (*chi2\_intron2* – clone de cDNA obtido a partir do mRNA do gene *chi2* retendo o segundo íntron; *chi2\_cdna* – clone de cDNA obtido a partir de mRNA do gene *chi2* completamente processado) e de seqüência de cDNA depositado em bancos de acesso público (NCBI; número de acesso AJ293217.1). Quadro destaca a retenção do segundo íntron. Regiões em cinza denotam incongruências entre as seqüências. Sete indica códon de parada em fase na seqüência do íntron retido.



**Figura 6.3: Padrão de transcrição das duas espécies de transcritos oriundas do gene *chi2*.** **A.** Hibridização de RNA extraído de *M. anisopliae* cultivado em diferentes meios de cultivo por (1) 24, (2) 48, (3) 72, (4) 96 e (5) 120 h. **B e C.** Perfil de expressão dos transcritos *chi2(1)* e *chi2(2)*, respectivamente. As barras representam a expressão absoluta em vezes, comparado com a expressão em glicose, de acordo com análise de densitometria óptica realizada com base em dois experimentos independentes de *Northern blot* ( $\pm$  D.P.).



**Figura 6.4: Análise quantitativa do padrão de transcrição do gene *chi2* e de suas duas formas de transcritos.** São apresentados os valores de expressão do gene *chi2* relativos ao gene normalizador *tub* ( $\beta$ -*tubulina*; painel A) e do transcrito parcialmente processado relativos ao transcrito totalmente processado (painel B). Os asteriscos (\*) representam diferenças estatísticas entre as médias pelo teste *t* de Student ( $P < 0,001$ ).

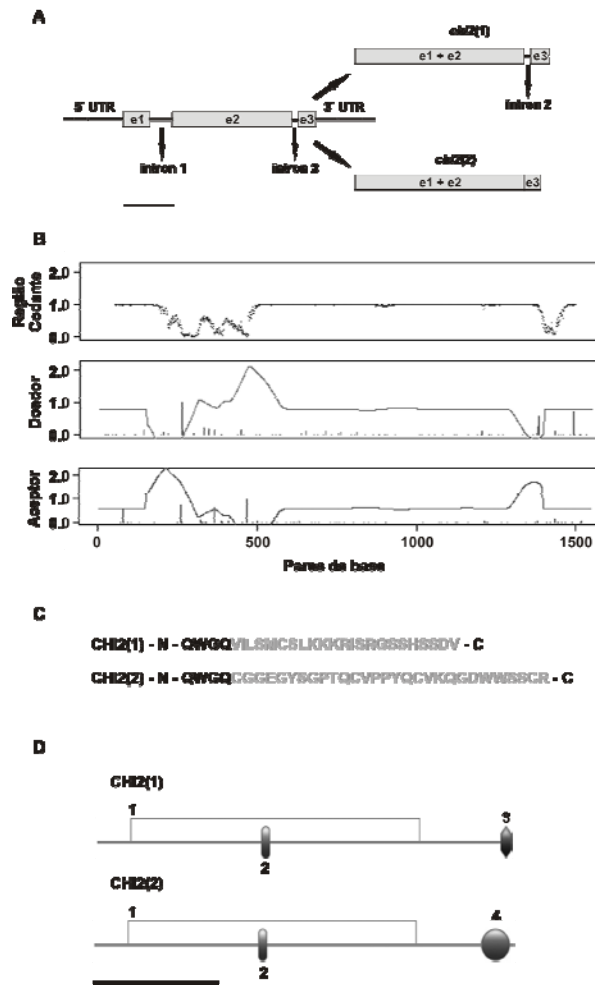
Os resultados de qPCR comparando a expressão do gene *chi2* relativa ao gene *tub* estão de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de *Northern blot* (Fig. 6.3), sendo reprimido em glicose 1 % e expresso em quitina cristalina 1 %, GlcNAc 0,25 % e GlcNAc 1%. Também como observado nos experimentos de *Northern blot*, existem diferenças na expressão entre os transcritos, apesar de não serem estatisticamente significantes entre os meios avaliados.

A partir destes resultados, procedemos para uma avaliação *in silico* tanto das regiões limítrofes entre éxons e íntrons quanto da predição de domínios possivelmente distintos presentes nas proteínas geradas a partir dos dois transcritos. Análises avaliando a consistência dos sítios aceptores e doadores de *splicing* do gene *chi2*, baseadas em estudos prévios em quatro genomas de *Aspergillus* (WANG ET AL., 2009), revelou a presença de todas as características consensuais suficientes para a ocorrência de *splicing* (sítio acceptor 5', sítio doador 3' e região de ligação de íntron *lariat*; Fig. 6.5 A). Portanto, o evento de *splicing* diferencial não ocorreria por erros no processamento, mas sim como um sistema regulado e possivelmente fisiologicamente importante. A Fig. 6.5 B representa as diferenças entre as regiões C-terminais de cada proteína oriunda dos diferentes transcritos. Ambas as proteínas apresentam domínios em comum, como o domínio catalítico da família 18 de hidrolases (valor de E:  $1.1e^{-17}$ ) e o domínio de ligação à quitina (valor de E:  $1.5e^{-16}$ ). Interessantemente, dois domínios distintos são encontrados na região C-terminal de cada proteína (regiões (2) domínio de ligação à quitina e (3) provável domínio de ancoramento por GPI rico em serina; Fig. 6.5 C). A proteína oriunda do gene completamente processado

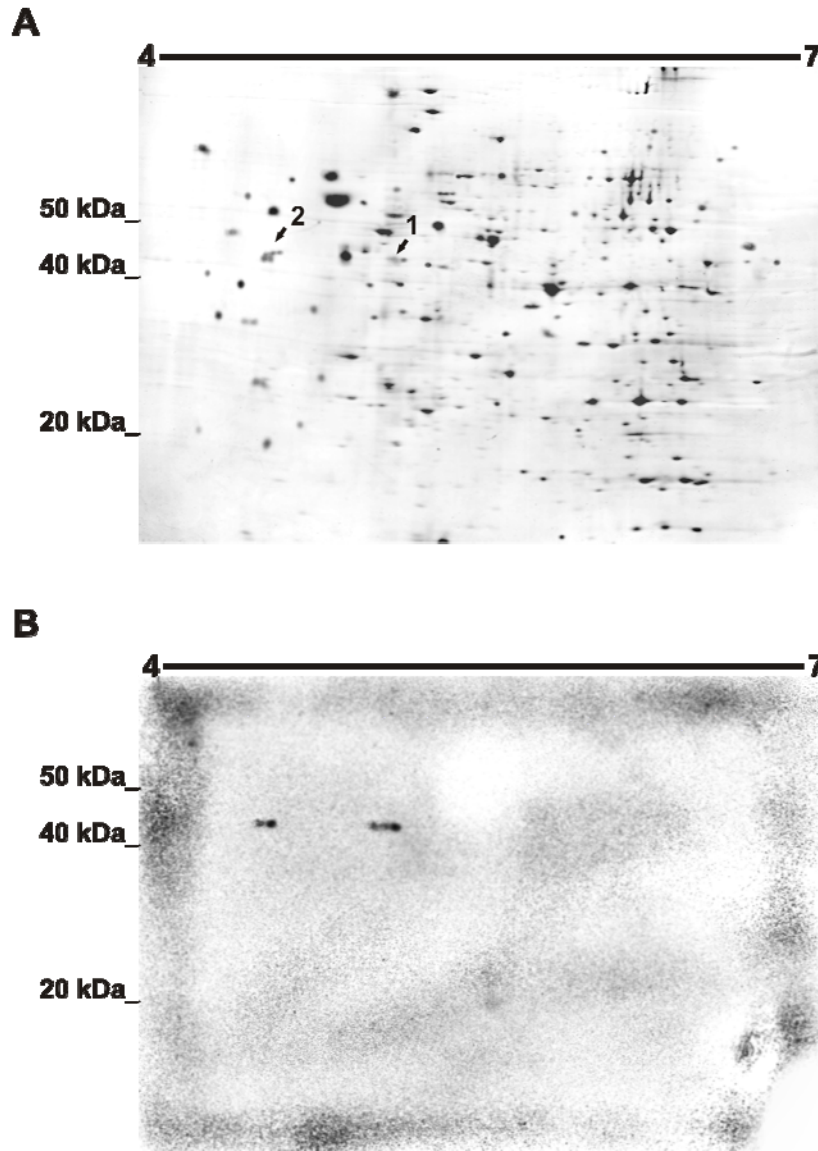
(CHI2(2)) apresenta um domínio de ligação à celulose (valor de E:  $2.7e^{-12}$ ), comum a hidrolases da família 18. Por sua vez, a proteína oriunda do transcrito parcialmente processado (CHI2(1)) apresenta uma região altamente hidrofóbica, podendo estar relacionada com GPI e, portanto, interagir com a membrana ou parede celular (valor de E:  $1.8e^{-2}$ ; Fig. 6.5 C). Apesar do baixo valor de E, esta característica deve ser investigada, pois existem relatos na literatura de regiões ancoradas por GPI em *Aspergillus* (ADAMS 2004).

### 6.3.2. Síntese de duas proteínas a partir do gene *chi2*

Com a comprovação da expressão dos dois transcritos, procedemos para a provável identificação de duas proteínas sendo expressas pelos diferentes transcritos. A diferença de aminoácidos entre as duas possíveis proteínas é de apenas 4 resíduos de aminoácidos, a massa molecular é muito próxima (45,06 kDa e 44,63 kDa para a forma completamente processada e para a forma parcialmente processada, respectivamente). Porém, os pIs estimados mostram-se distintos, sendo que a proteína expressa a partir da forma completamente processada possui pI de 4,26 e a parcialmente processada apresentaria pI de 4,62, sendo passível a sua separação em tiras para eletrofocalização com pH restrito. Desta forma, realizamos a análise das proteínas expressas por ambas as formas de transcritos por *Western blot* bidimensional (Fig. 6.6).



**Figura 6.5: Síntese de duas proteínas a partir do gene *chi2* e análises *in silico*. A.** Representação da síntese de dois transcritos por *splicing* diferencial. **B.** Predição dos sítios de *splicing*. Painei “Região Codante” – valores da curva próximos a 0.0 indicam região intrônica, enquanto valores da curva próximos a 1.0 indicam regiões exônicas; painei “Doador” – impulsos e curva próximos a 2.0 indicam sítio doador forte; painei “Aceptor” - impulsos e curva próximos a 2.0 indicam sítio aceptor forte. **C.** Diferenças entre aminoácidos das regiões C-terminal entre as duas proteínas geradas a partir dos dois transcritos. CHI2(1) – proteína obtida a partir do mRNA parcialmente processado; CHI2(2) – proteína obtida a partir do mRNA totalmente processado. **D.** Análise dos domínios das duas proteínas geradas a partir do gene *chi2*. 1 – Domínio catalítico de glicosil hidrolases da família 18 (valor de E:  $1.1e^{-17}$  para ambas as proteínas); 2 – Domínio de ligação à quitina (valor de E:  $1.5e^{-16}$  para ambas as proteínas); 3 – Provável domínio de ancoramento por GPI rico em serina (valor de E:  $1.8e^{-2}$ ); 4 – Domínio de ligação à celulose (valor de E:  $2.7e^{-12}$ ).



**Figura 6.6: Duas proteínas são sintetizadas pelo gene *chi2*.** **A.** 2D SDS-PAGE de proteínas obtidas a partir de sobrenadante de cultura de *M. anisopliae* em meio indutor de quitinases após 96 h a 28 °C e 150 RPM. (1) - *spot* relativo à quitinase CHI2(1); (2) – *spot* relativo à quitinase CHI2(2). **B.** Análise por *Western blot* a partir de gel bidimensional.

Para confirmar a expressão das duas formas de proteínas a partir do gene *chi2*, realizamos a identificação dos *spots* por espectrometria de massas (Tabela 6), confirmando tratar-se de duas proteínas com seqüências distintas, ambas geradas a partir do gene *chi2*.



**Tabela 6. Identificação de proteínas por análise de MS/MS evidencia a síntese de duas diferentes proteínas a partir do gene *chi2*.**

Spot ID	Nome da Proteína	Número de Acesso	pI/MM (kDa) Teóricas	pI/MM (kDa) Observadas	PEAKS Score (%)	Cobertura da Seqüência (%)	Peptídeos Identificados (mais representativos)
1	CHI2(1)	CAC07216	5.26/43.7	4.63/44.1	100	17	PLTDK ALGINGNAPFNYNWTSFIADTPSAGAK IFIGVPASPLASTGTPSGAQYYAAPEQLAAIVGEYR QGDWSSCR
2	CHI2(2)	-	6.28/43.0	5.32/43.6	100	67	LTDKISV ALGINGNAPFNYNWTSFIADTPSAGAKIFI ISVKPR GQVILSMCSLKKKR

## 7. Discussão

O subgrupo Fungi contem uma grande variedade de organismos com estilos de vida muito diversos. Isto é um reflexo direto da variedade de habitats ocupados pelos fungos. Dentre os nichos ocupados por fungos filamentosos, os fungos considerados patógenos de artrópodes terrestres têm sido alvos de inúmeros estudos devido não só ao seu interesse econômico como agentes de controle biológico, regulando as populações de insetos no planeta, mas principalmente como modelos da interação patógeno-hospedeiro e de co-evolução (ROY *ET AL.*, 2006).

O processo de infecção de fungos entomopatógenos não é exclusivo e apresenta muitas semelhanças com o de fungos fitopatógenos, pois ambos os processos iniciam com a deposição de propágulos viáveis sobre estruturas de hospedeiros suscetíveis e seguem com a penetração direta da cutícula auxiliada por pressão mecânica e secreção de enzimas hidrolíticas. Após a penetração e colonização, ocorre a produção de blastosporos, facilitando a difusão do patógeno pelo organismo infectado. Tão logo os nutrientes tornam-se escassos, hifas desenvolvem-se a partir dos blastosporos e rompem novamente os tecidos mais externos dos hospedeiros para, então, produzirem novos propágulos infectivos (SEXTON & HOWLETT 2006). É provável a existência de ancestralidade comum entre fito- e entomopatógenos do filo Ascomycota, mas o sistema de infecção em si acredita-se ser filogeneticamente mais distante e tenha surgido por convergência evolutiva em Ascomycota, Basidiomycota e Zigomycota, sendo a maioria dos fungos

entomopatógenos pertencentes aos filos Ascomycota e Zigomycota (ROY *ET AL.*, 2006).

O processo de infecção somente ocorre quando os organismos envolvidos possuem as condições mínimas necessárias, ou seja, o patógeno deve apresentar a capacidade de diferenciar-se nas estruturas de penetração e possuir um arsenal bioquímico, permitindo tanto a invasão do hospedeiro, sobrepujando suas defesas, quanto a nutrição do fungo. Por sua vez, o hospedeiro deve ser de certa forma suscetível ao patógeno, apesar de responder ao seu ataque munindo-se de barreira física (carapaça), resposta imune inata e mudança de comportamento (ROY *ET AL.*, 2006). Condições ambientais favoráveis também influenciam a patogenia, como a temperatura e a umidade (MILLER *ET AL.*, 2004; RANGEL *ET AL.*, 2004; RANGEL *ET AL.*, 2005b; RANGEL *ET AL.*, 2005a; BRAGA *ET AL.*, 2006; FERNANDES *ET AL.*, 2008). Portanto, a infecção de organismos suscetíveis por fungos patógenos depende de uma tríade de elementos e, dentro de cada elemento, inúmeros fatores contribuem para aumentar a complexidade do processo.

Analisando fungos entomopatógenos, em especial *M. anisopliae*, e levando-se em consideração o número de hospedeiros deste fungo, podemos separá-lo em duas tipos: generalistas e especializados. A interação fungo-hospedeiro é o evento determinante se o processo de infecção ocorrerá ou não. Co-evoluindo com seus hospedeiros, *Metarhizium* desenvolveu metodologias para subjugar as defesas destes hospedeiros e, de certa forma, isolados deste fungo apresentam diferentes níveis de virulência frente a diferentes hospedeiros. Isso, possivelmente, se deve às diferenças no conteúdo gênico entre os isolados. Em um estudo envolvendo EST's de

linhagens generalistas e especializadas na infecção de artrópodes, evidenciaram-se divergências não somente na seqüência, mas também na ausência de determinados genes. Por exemplo, a linhagem Ma443 não possui o gene, entre outros, da endoquitinase de 42 kDa CHI2 alvo de estudo desta Tese, quando comparada à linhagem Ma2575. Isto demonstra que a ausência de certos genes torna a linhagem Ma443 especializada em poucas espécies de hospedeiros em comparação à linhagem generalista Ma2575 (WANG *ET AL.*, 2009).

As buscas por possíveis fatores de patogenicidade iniciaram com o estudo de enzimas cujo papel seria a degradação da cutícula dos hospedeiros, como proteases, lipases e quitinases. *Metarhizium* secreta, de acordo com zimogramas avaliando a atividade de quitinases em sobrenadantes de cultivo, cerca de 6 diferentes quitinases (DA SILVA *ET AL.*, 2005). É provável haver a atuação de diferentes quitinases no processo de infecção de diferentes hospedeiros ou, ainda, a ação sinérgica destas enzimas de forma a degradar completamente as fibras de quitina extracelular a monômeros de GlcNAc para a nutrição do fungo. Sabe-se, também, da necessidade de quitinases para o desenvolvimento do próprio fungo, pois a parede celular destes organismos é rica em quitina e precisa ser rompida para o crescimento (DUO-CHUAN 2006).

Devido à grande importância das quitinases para a nutrição e desenvolvimento de *Metarhizium*, vários trabalhos foram realizados visando estabelecer o papel específico de cada quitinase. O gene da endoquitinase CHI2 (gene *chi2*) foi parcialmente obtido em um estudo avaliando EST's de *Metarhizium* cultivado em meios mimetizando as condições de infecção (FREIMOSER *ET AL.*, 2003). Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, o

gene *chi2* foi isolado em sua totalidade e caracterizado quanto ao controle de sua expressão em meios sintéticos mimetizando ou não condições de infecção e quanto a seqüências regulatórias presentes em seu promotor. Observou-se a repressão deste gene em condições de cultivo na presença de glicose e ativação em meios contendo quitina ou GlcNAc (BARATTO *ET AL.*, 2006). A seqüência deduzida de aminoácidos também apresenta região de peptídeo sinal, indicando a provável secreção desta enzima. Portanto, devido à regulação da expressão deste gene, *chi2* tornou-se um alvo interessante para posteriores estudos. Desta forma, o gene *chi2* foi selecionado para a caracterização da sua funcionalidade, constituindo o cerne da investigação e da discussão desta Tese.

O estudo funcional do gene *chi2* foi iniciado com a construção de dois diferentes *cassettes*. Primeiramente, construímos um *cassette* para a expressão constitutiva e aumentada do cDNA do gene *chi2* utilizando o promotor homólogo do gene *tef1- $\alpha$*  (fator de alongamento de cadeia). Utilizando experimentos de agro-transformação, obtivemos um grande número de transformantes a serem analisados. Foram obtidos cerca de 60 transformantes resistentes a glifosinato de amônio em cada evento de ATMT realizado em placas de Petri de 90x15 mm. Em 200 transformantes avaliados, 152 transformantes foram positivos.

A metodologia de superexpressão de quitinases em fungos entomopatógenos já foi utilizada por outros autores em outros trabalhos. Em *Metarhizium*, o primeiro experimento de superexpressão de quitinases foi realizado em 2001, com a expressão do gene *chit1* e, apesar de implicar em um aumento nos níveis de quitinases secretadas, o aumento da virulência não

fora detectado (SCREEN ET AL., 2001). Outro fungo entomopatogênico, *B. bassiana*, também foi utilizado em experimentos de superexpressão de quitinase. O incremento na expressão do gene *Bbchit1* causou aumento de virulência do fungo quando submetido a bioensaios utilizando como hospedeiros afídeos da espécie *Myzus persicae* (FANG ET AL., 2005). Nosso grupo também realizou experimentos de superexpressão de quitinases. Porém, evidências indicam toxicidade na superexpressão do gene *chi3*, pois não foram obtidos transformantes viáveis. Por outro lado, a participação da quitinase CHIT30, codificada pelo gene *chi3*, no processo de infecção do hospedeiro *D. peruvianus* foi demonstrada. Transformantes com expressão nula deste gene, além de apresentarem crescimento prejudicado em relação à linhagem selvagem quanto expostos ao choque térmico, também causaram mortalidade reduzida (STAATS 2007).

Outra estratégia pode ser aliada à superexpressão para inferir com maior precisão o papel de determinado gene em um processo. A deleção de genes vem sendo amplamente utilizada com este intuito. Além do *cassette* para a superexpressão de *chi2*, também construímos um *cassette* de deleção do gene *chi2*. Para tanto, utilizamos a metodologia de PCR de fusão (YU ET AL., 2004), flanqueando a marca de resistência por porções 5' e 3' do gene *chi2* com o objetivo de silenciar o gene por recombinação homóloga da marca. O rendimento foi menor em comparação aos experimentos de superexpressão, com cerca de 40 transformantes por placa de Petri. Em cerca de 150 transformantes resistentes a glifosinato, apenas dois continham a inserção do *cassette* no sítio homólogo, apesar da ATMT promover este tipo de integração. A baixa integração no sítio homólogo, neste caso, pode ser devido ao tamanho

das regiões flanqueadoras utilizado (520 pb na região 5' e 632 na região 3'). Em fungos como *Neurospora crassa*, apenas regiões flanqueadoras acima de 1 Kb são suficientes para promover a integração em sítio homólogo. Na espécie *A. niger*, cujo gênero é filogeneticamente próximo a *Metarhizium*, são necessários 1,5 Kb para altas taxas de integração homóloga (BARDIYA & SHIU 2007; MEYER ET AL., 2007).

Deleções dos genes *mad1* (adesina) (WANG & ST LEGER 2007b), *mpl1* (perilipinas) (WANG & ST LEGER 2007a), *MaPKA1* (PKA) (FANG ET AL., 2009), *cag8* (RGS) (FANG ET AL., 2007) e *mcl1* (colágeno tipo I) (WANG & ST LEGER 2006) demonstraram redução na infecção dos artrópodes desafiados contra os mutantes nulos quando comparada aos níveis de infecção da linhagem selvagem e elucidaram a função dos genes avaliados, mostrando ser uma metodologia eficiente para tal objetivo.

Ambas as metodologias de superexpressão e deleção demonstraram ser eficientes. Ensaio de atividade de quitinase, realizados com sobrenadantes de cultivo de *Metarhizium* em condições de indução e repressão do sistema de quitinases, resultaram em significativas diferenças nos níveis de atividade tanto de quitinases total quanto de endoquitinases especificamente. Outros trabalhos já demonstraram que a alteração na expressão de transcritos de genes do sistema hidrolítico de entomopatógenos refletem na atividade enzimática. Ensaio com transformantes contendo *cassettes* para expressão constitutiva do gene *chit1* tiveram incremento de até 140 vezes na expressão de quitinases em meios não indutores, porém sem acarretar em aumento na virulência a *Manduca sexta* (SCREEN ET AL., 2001). O gene *pr1* foi expresso de forma constitutiva em *Metarhizium* e aumentou a virulência do fungo em 25 % em

ensaios utilizando *M. sexta* (ST LEGER ET AL., 1996b). No fungo *B. bassiana*, a super-expressão do gene *Bbchit1*, além de elevar os níveis de expressão de quitinases, houve aumento nos níveis de virulência frente a afídeos (FANG ET AL., 2005).

A deleção da quitinase *ech42* de *T. harzianum* comprovou a participação do gene em processos de aquisição de nutrientes externos e mostrou ser um determinante de patogenicidade (CARSOLIO ET AL., 1994). Em *A. nidulans*, a deleção do gene *chiA* provocou diminuição nas taxas de germinação de conídios e de desenvolvimento de hifas. Ensaios avaliando a expressão deste gene demonstraram alta atividade em conidióforos, demonstrando a atuação do mesmo durante a morfogênese do fungo (TAKAYA ET AL., 1998b).

Os transformantes obtidos nos ensaios de super-expressão e de deleção do gene *chi2*, confirmados pela integração dos *cassettes* e por ensaios de análise de transcritos e de síntese de CHI2, apresentaram diferenças nos níveis de virulência quando testados em bioensaios utilizando o inseto *D. peruvianus*. A linhagem deletada  $\Delta chi2$  teve uma redução de 19 % em seu TL<sub>50</sub>, enquanto a linhagem T33 apresentou um aumento de 20 % em seu TL<sub>50</sub>. Avaliando as características morfológicas celulares dos transformantes, pudemos observar, pelos ensaios de microscopia de imunofluorescência, a manutenção da morfologia de conídios, hifas e apressórios, mantendo-se semelhantes à linhagem selvagem. Este fato também ocorre em *Clonostachys rosea*, onde o nocaute de três diferentes quitinases, apesar da redução na sua virulência, não apresenta diferenças morfológicas (MAMARABADI ET AL., 2008). Portanto, é provável a participação de CHI2 na aquisição de nutrientes exógenos e não dos processos morfológicos.



Um extenso estudo analisando a expressão de diferentes genes em linhagens de *Metarhizium* consideradas generalistas ou especializadas na infecção de hospedeiros ajuda a corroborar a participação de CHI2 no processo de infecção. A linhagem Ma2575, considerada generalista, expressa o gene *chi2*, enquanto a linhagem especializada Ma443 não possui este gene em seu genoma (WANG ET AL., 2009). É possível que a ausência desta quitinase, juntamente a outros genes, seja responsável pela diminuição no espectro de infecção desta linhagem, motivada pela redução da diversidade destas hidrolases.

As evidências encontradas neste trabalho indicam a participação da quitinase CHI2 na aquisição de nutrientes externos à célula, provavelmente degradando a quitina presente nos tecidos dos hospedeiros e permitindo a incorporação de polímeros de GlcNAc solúveis. Porém, a observação da distribuição da quitinase CHI2 em diferentes estruturas celulares de *Metarhizium* durante os ensaios de microscopia de imunofluorescência permitiram inferir em outra possível função. Em geral, CHI2 apresenta-se ligada à parede celular e dispersa no citoplasma em hifas, possivelmente dentro de vacúolos transportados através dos microtúbulos em via de secreção (STEINBERG 2007), além de acumular-se na extremidade distal da estrutura.

Quando há a formação de apressório, a quitinase CHI2 associa-se exclusivamente à parede celular, ficando ausente no citoplasma e acumulando-se na ponta do apressório, como ocorre com a quitinase CHIT30 (STAATS 2007). CHI2 é completamente ausente em esporos germinados. A suposição de outra possível função de CHI2 vem do fato da distribuição de CHI2 em regiões de intenso remodelamento da parede celular, como no ponto de

germinação dos esporos e no ponto de formação do apressório. Este padrão de distribuição muda consideravelmente no transformante T33, no qual há a presença de CHI2 no esporo, além de um aumento global na expressão em todos os tipos celulares. Juntamente com outras endoquitinases, CHI2 poderia participar, também, do remodelamento da parede celular. Porém, como os transformantes nulos para a expressão de CHI2 não apresentaram diferenças morfológicas, esta suposição não pode ser comprovada e necessita maior investigação, como, por exemplo, a construção de linhagens deletadas para mais de uma endoquitinase.

Interessantemente, CHI2 associa-se à parede celular mesmo apresentando peptídeo-sinal de exportação em sua região N-terminal e ser detectada na fração secretada em cultivos líquidos de *Metarhizium*. Este fato pode ser explicado pela constante síntese desta enzima durante o desenvolvimento de *Metarhizium* em condições de infecção ou simulando o contato entre o esporo e a cutícula de hospedeiros, e as regiões apresentando CHI2 seriam, temporalmente, pontos de secreção anteriores aos mais recentes, presentes na região distal da hifa crescente ou no apressório.

Porém, analisando a expressão do gene *chi2* em ensaios de RT-PCR, pudemos observar a presença de dois transcritos. Prontamente, acreditamos ser produto de contaminação com DNA genômico. Contudo, o resultado manteve-se constante e ambos os produtos foram clonados e seqüenciados, revelando a retenção do segundo íntron, de 72 pb. Posteriormente, o cDNA completo de ambas as espécies de transcrito foi também clonado e sequenciado. Este revelou apenas a retenção do segundo íntron e, em todos os clones analisados, apenas este era retido, enquanto o primeiro íntron era

removido. A presença de dois transcritos poderia levar à formação de duas proteínas: a primeira, oriunda do processamento não usual (CHI2(1)), possuiria resíduos de aminoácidos referentes aos dois primeiros éxons e ao segundo íntron apenas, devido à presença de um sinal de parada de tradução em fase no último códon do íntron; a segunda, oriunda do processamento completo (CHI2(2)), possuiria os resíduos referentes aos três éxons. Este fato revelou-se passível de constituir-se em um evento de *splicing* alternativo, nunca antes descrito em fungos entomopatógenos, porém amplamente distribuído em fungos em geral.

Análises de *Northern blot* e qRT-PCR confirmaram a presença dos dois transcritos. Porém, como a síntese de duas proteínas diferentes não havia sido comprovada, o evento de processamento diferencial do mRNA do gene *chi2* foi denominado de *splicing* alterado, termo proposto por Larrondo, em 2004, para definir a presença de transcritos oriundos de processamentos diferenciais sem a síntese de proteínas maduras observados em transcritos do fungo *P. chrysosporium*, em detrimento ao já bem descrito *splicing* alternativo, cujos transcritos levam à geração de proteínas maduras e funcionais.

Análises *in silico* revelaram diferenças pontuais e funcionalmente importantes nas duas proteínas possivelmente sintetizadas a partir dos dois diferentes transcritos do gene *chi2*. A proteína CHI2 sintetizada a partir do transcrito completamente processado (aqui chamada CHI2(2)) apresenta características conservadas em endoquitinases da família 18 de glicosil hidrolases. Possui domínio catalítico de quitinases e, inserido a ele, domínio de ligação à quitina. A região N-terminal apresenta peptídeo-sinal de exportação. Na porção C-terminal, relativa ao terceiro éxon, há a presença de uma região

de ligação à celulose, característico desta família de hidrolases. A seqüência predita de aminoácidos da proteína CHI2 oriunda do transcrito parcialmente processado (chamada CHI2(1)) possui as regiões de domínio catalítico, de ligação à quitina e de peptídeo-sinal idênticas à proteína CHI2(2), porém não possui a região de ligação à celulose. Na porção C-terminal, relativa ao segundo íntron, há uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos, indicando uma possível interação com a membrana celular e, conseqüentemente, ficando ancorada a ela por GPI ou à própria parede por vestígios de GPI. Este tipo de interação já foi relatado em *A. fumigatus* (ADAMS 2004). Por esta razão CHI2(1) ficaria ancorada à membrana ou parede celular e CHI2(2) seria secretada. A detecção de CHI2(1) em sobrenadante de cultivo se deu, provavelmente, à autólise de hifas devido ao tempo de cultivo e liberação de proteínas associadas à parede e membrana celulares, como já descrito em *Aspergillus* (EMRI ET AL., 2008). A presença da enzima CHI2(1) na membrana ou parede celular poderia estar associada à quebra da quitina endógena, permitindo o desenvolvimento do fungo, ou como uma molécula “sensora”, iniciando a degradação da cutícula e sinalizando à célula a presença de hospedeiro apto a ser infectado.

Demonstramos, por *Western blot*, o reconhecimento de dois *spots* com massa aproximada à predita pela análise *in silico*. A proteína CHI2(1) tem massa e pI preditos de 43.0 kDa e 6.28, respectivamente, e a proteína CHI2(2) possui massa e pI preditos de 43.7 kDa e 5.26, respectivamente. As massas definidas experimentalmente de CHI2(1) e CHI2(2) foram de 43.6 e 44.1, respectivamente. Porém, os pI diferiram consideravelmente: 5.32 para CHI2(1) e 4.63 para CHI2(2). O fato de haver diferença nos valores de pI é devido às

modificações pós-traducionais não previstas pelos programas nos quais as análises *in silico* foram realizadas (ExpPASy e JvirGel v. 2.2) e já foi discutido na literatura (HILLER *ET AL.*, 2003) O reconhecimento dos *spots* foi realizado com antisoro produzido contra a seqüência de aminoácidos comum a ambas as proteínas. Os *spots* relativos ao reconhecimento pelo antisoro foram submetidos à espectrometria de massas. Ambos os *spots* foram identificados e as seqüências são relativas à proteína CHI2. Além disso, foi possível identificar regiões específicas na porção N-terminal de cada *spot* e, com este resultado, pudemos confirmar a síntese de CHI2(1) e CHI2(2). Logo, consideramos o evento de *splicing* alternativo como responsável pela geração de dois transcritos, pois a proteína identificada não se apresenta truncada. Dessa forma, são sintetizadas duas espécies de mRNA a partir do gene *chi2*, por *splicing* alternativo, responsáveis pela síntese de duas proteínas (CHI2(1) e CHI2(2)), com características químicas distintas e com características biológicas possivelmente diferentes. Estudos avaliando a função biológica específica da proteína CHI2(1) deverão ser realizados.

Finalizando, a endoquitinase CHI2 faz parte do processo de infecção de *M. anisopliae* frente ao inseto *D. peruvianus*, constituindo-se em um fator de virulência importante na degradação da cutícula dos hospedeiros suscetíveis. Este fato foi observado por bioensaios utilizando transformantes de *M. anisopliae* super-expressando ou com expressão nula de CHI2, cujas morfologias mantiveram-se semelhantes à linhagem selvagem. Assim, podemos concluir que CHI2 participa ativamente da degradação da cutícula dos hospedeiros, provendo nutrição à célula fúngica. Além disso, o gene *chi2* apresenta dois transcritos gerados por *splicing* alternativo. Por sua vez, estes

transcritos são traduzidos em proteínas maduras com distintas seqüências de aminoácidos em suas porções C-terminais, com predição de domínios distintos entre as espécies de proteínas, refletindo um possível papel diferenciado entre as duas formas.

## 8. Conclusões

- a proteína CHI2 faz parte do processo de infecção de *M. anisopliae* e constitui-se em um fator de virulência transformantes;
- o gene *chi2* sofre processo de *splicing* alternativo, resultando na expressão de duas quitinases com seqüência de aminoácidos distinta;

## 9. Perspectivas

- avaliar o papel biológico de cada endoquitinase gerada a partir dos transcritos do gene *chi2*;
- identificar e comprovar a síntese de diferentes transcritos e proteínas a partir de outros genes de *M. anisopliae* linhagem E6;
- construir transformantes nulos para mais de um gene de endoquitinases ou de exoquitinases.



## 10. Referências utilizadas

- ABRAMOFF, M. D.; P. J. MAGALHAES; S. J. RAM. Image Processing with ImageJ. *Biophot Int*, 11(7):36-42. 2004.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150(7):2029-35. 2004.
- ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba/FEALQ. 1163p. 1998.
- ARRUDA, V. 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. 2005.
- ARRUDA, W.; I. LUBECK; A. SCHRANK; M. H. VAINSTEIN. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol*, 37(3-4):231-44. 2005.
- BABA, Y.; A. SHIMONAKA; J. KOGA; H. KUBOTA; T. KONO. Alternative splicing produces two endoglucanases with one or two carbohydrate-binding modules in *Mucor circinelloides*. *J Bacteriol*, 187(9):3045-51. 2005.
- BAGGA, S.; G. HU; S. E. SCREEN; R. J. ST LEGER. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324:159-69. 2004.
- BANKS, R. E.; M. J. DUNN; D. F. HOCHSTRASSER; J. C. SANCHEZ; W. BLACKSTOCK; D. J. PAPPIN; P. J. SELBY. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*, 356(9243):1749-56. 2000.
- BARATTO, C. M.; M. V. DA SILVA; L. SANTI; L. PASSAGLIA; I. S. SCHRANK; M. H. VAINSTEIN; A. SCHRANK. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 49(11):723-6. 2003.

- BARATTO, C. M.; V. DUTRA; J. T. BOLDO; L. B. LEIRIA; M. H. VAINSTEIN; A. SCHRANK. Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Curr Microbiol*, 53(3):217-21. 2006.
- BARDIYA, N.; P. K. SHIU. Cyclosporin A-resistance based gene placement system for *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, 44(5):307-14. 2007.
- BARRETO, C. C.; C. C. STAATS; A. SCHRANK; M. H. VAINSTEIN. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr Microbiol*, 48(2):102-7. 2004.
- BERNARD, M.; J. P. LATGE. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol*, 39 Suppl 1:9-17. 2001.
- BHADAURIA, V.; W. S. ZHAO; L. X. WANG; Y. ZHANG; J. H. LIU; J. YANG; L. A. KONG; Y. L. PENG. Advances in fungal proteomics. *Microbiol Res*, 162(3):193-200. 2007.
- BHATTACHARYA, A.; S. BANERJEE; A. DATTA. Regulation of N-acetylglucosamine kinase synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 374(3):384-91. 1974a.
- BHATTACHARYA, A.; M. PURI; A. DATTA. Induction of N-acetylglucosamine kinase in yeast. *Biochem J*, 141(2):593-5. 1974b.
- BHATTACHARYA, D.; A. NAGPURE; R. K. GUPTA. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol*, 27(1):21-8. 2007.
- BIDOCHKA, M. J.; R. ST LEGER; D. W. ROBERTS. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171:213-224. 1997.
- BIDOCHKA, M. J.; DE KONING, J.; ST LEGER, R. J. Analysis of a genomic clone of hydrophobin (*ssgA*) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 105:360–364. 2001.
- BIRCH, P. R.; P. F. SIMS; P. BRODA. Substrate-dependent differential splicing of introns in the regions encoding the cellulose binding domains of two exocellobiohydrolase I-like genes in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 61(10):3741-4. 1995.

- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4):512-530. 2009.
- BISWAS, M.; B. SINGH; A. DATTA. Induction of N-acetylmannosamine catabolic pathway in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 585(4):535-42. 1979.
- BOEL, E.; I. HJORT; B. SVENSSON; F. NORRIS; K. E. NORRIS; N. P. FIIL. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J*, 3(5):1097-102. 1984.
- BOGO, M. R.; C. A. ROTA; H. PINTO, JR.; M. OCAMPOS; C. T. CORREA; M. H. VAINSTEIN; A. SCHRANK. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol*, 37(4):221-5. 1998.
- BRAGA, G. U.; D. E. RANGEL; S. D. FLINT; A. J. ANDERSON; D. W. ROBERTS. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem Photobiol*, 82(2):418-22. 2006.
- BRETT, D.; H. POSPISIL; J. VALCARCEL; J. REICH; P. BORK. Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet*, 30(1):29-30. 2002.
- BRODA, P.; P. R. BIRCH; P. R. BROOKS; P. F. SIMS. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. *Mol Microbiol*, 19(5):923-32. 1996.
- BROWN, P. O.; D. BOTSTEIN. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, 21(1 Suppl):33-7. 1999.
- BRUNNER, K.; M. MONTERO; R. L. MACH; C. K. PETERBAUER; C. P. KUBICEK. Expression of the *ech42* (endochitinase) gene of *Trichoderma atroviride* under carbon starvation is antagonized via a BrIA-like cis-acting element. *FEMS Microbiol Lett*, 218(2):259-64. 2003.
- BUTLER, A. R.; R. W. O'DONNELL; V. J. MARTIN; G. W. GOODAY; M. J. STARK. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem*, 199(2):483-8. 1991.
- BUTT, T. M.; C. JACKSON; N. MAGAN. Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. *Fungi as biocontrol agents*, CABI publishing, Willingford, Oxford, USA. 2001.

- CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 59:59-101. 1987.
- CARSOLIO, C.; A. GUTIERREZ; B. JIMENEZ; M. VAN MONTAGU; A. HERRERA-ESTRELLA. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23):10903-7. 1994.
- CLARKSON, J. M.; A. K. CHARNLEY. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol*, 4(5):197-203. 1996.
- CLERGEOT, P. H.; M. GOURGUES; J. COTS; F. LAURANS; M. P. LATORSE; R. PEPIN; D. THARREAU; J. L. NOTTEGHEM; M. H. LEBRUN. PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(12):6963-8. 2001.
- COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta*, 113(1):51-6. 1966.
- COVERT, S.; P. KAPOOR; M. LEE; A. BRILEY; C. NAIRN. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol Res*, 105:259-264. 2004.
- CURACH, N. C.; V. S. TE'O; M. D. GIBBS; P. L. BERGQUIST; K. M. NEVALAINEN. Isolation, characterization and expression of the *hex1* gene from *Trichoderma reesei*. *Gene*, 331:133-40. 2004.
- DA SILVA, M. V.; L. SANTI; C. C. STAATS; A. M. DA COSTA; E. M. COLODEL; D. DRIEMEIER; M. H. VAINSTEIN; A. SCHRANK. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol*, 156(3):382-92. 2005.
- DAVIS, C. A.; L. GRATE; M. SPINGOLA; M. ARES, JR. Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic Acids Res*, 28(8):1700-6. 2000.
- DE LAS MERCEDES DANA, M.; J. A. PINTOR-TORO. Post-transcriptional control of a glucoamylase gene from *Trichoderma harzianum* under stress conditions. *Mol Microbiol*, 57(1):250-60. 2005.

- DE MELO, D. R.; E. K. FERNANDES; G. L. DA COSTA; F. B. SCOTT; V. R. BITTENCOURT. Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*. Ann N Y Acad Sci, 1149:388-90. 2008.
- DONG, C.; J. ZHANG; W. CHEN; H. HUANG; Y. HU. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. Microbiol Res, 162(1):53-61. 2007.
- DRIVER, F.; R. J. MILNER; J. W. H. TRUEMAN. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol Res, 104:134-150. 2000.
- DROUILLARD, S.; S. ARMAND; G. J. DAVIES; C. E. VORGIAS; B. HENRISSAT. *Serratia marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation. Biochem J, 328 ( Pt 3):945-9. 1997.
- DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. Mycopathologia, 161(6):345-60. 2006.
- DUTRA, V.; L. NAKAZATO; L. BROETTO; I. SILVEIRA SCHRANK; M. HENNING VAINSTEIN; A. SCHRANK. 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(4):245-51. 2004.
- EBBOLE, D. J.; J. L. PALUH; M. PLAMANN; M. S. SACHS; C. YANOFSKY. *cpc-1*, the general regulatory gene for genes of amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*, is differentially expressed during the asexual life cycle. Mol Cell Biol, 11(2):928-34. 1991.
- EBBOLE, D. J.; Y. JIN; M. THON; H. PAN; E. BHATTARAI; T. THOMAS; R. DEAN. Gene discovery and gene expression in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*: analysis of expressed sequence tags. Mol Plant Microbe Interact, 17(12):1337-47. 2004.
- ELLIOT, S. L.; S. BLANFORD; M. B. THOMAS. Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. Proc Biol Sci, 269(1500):1599-607. 2002.

- EMRI, T.; Z. MOLNAR; M. SZILAGYI; I. POCSI. Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol*, 151(2-3):211-20. 2008.
- FAN, Y.; W. FANG; S. GUO; X. PEI; Y. ZHANG; Y. XIAO; D. LI; K. JIN; ET AL. . Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Appl Environ Microbiol*, 73(1):295-302. 2007.
- FANG, W.; B. LENG; Y. XIAO; K. JIN; J. MA; Y. FAN; J. FENG; X. YANG; ET AL. . Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Appl Environ Microbiol*, 71(1):363-70. 2005.
- FANG, W.; Y. PEI; M. J. BIDOCHKA. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153(Pt 4):1017-25. 2007.
- FANG, W.; M. PAVA-RIPOLL; S. WANG; R. ST LEGER. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol*, 46(3):277-85. 2009.
- FERNANDES, E. K.; D. E. RANGEL; A. M. MORAES; V. R. BITTENCOURT; D. W. ROBERTS. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *J Invertebr Pathol*, 98(1):69-78. 2008.
- FRANCESCHINI, M. Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato bovino *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. 2005.
- FRAZZON, A. P.; I. DA SILVA VAZ JUNIOR; A. MASUDA; A. SCHRANK; M. H. VAINSTEIN. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*, 94(1-2):117-25. 2000.
- FREIMOSER, F. M.; S. SCREEN; S. BAGGA; G. HU; R. J. ST LEGER. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a pleth of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiol*, 149(Pt 1):239-47. 2003.

- GIAEVER, G.; A. M. CHU; L. NI; C. CONNELLY; L. RILES; S. VERONNEAU; S. DOW; A. LUCAU-DANILA; *ET AL.* . Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896):387-91. 2002.
- GILLESPIE, J. P.; R. BATEMAN; A. K. CHARNLEY. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J Invertebr Pathol*, 71(2):128-37. 1998.
- GOMEZ-GOMEZ, E.; M. ISABEL; G. RONCERO; A. DI PIETRO; C. HERA. Molecular characterization of a novel endo-beta-1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet*, 40(4):268-75. 2001.
- HADLEY, N. F. Fine structure of the cuticle of the black widow spider with reference to surface lipids. *Tissue Cell*, 13(4):805-17. 1981.
- HAUGLAND, R. A.; BRINKMAN, N.; VESPER, S. J. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J Microbiol Meth*, 50(3):319-323. 1999.
- HENRISSAT, B. Classification of chitinases modules. *EXS*, 87:137-56. 1999.
- HILLER, K.; SCHOBERT, M.; HUNDERTMARK, C.; JAHN, D.; MUNCH, R. JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3862-3865. 2003.
- HOLLIS, T.; A. F. MONZINGO; K. BORTONE; S. ERNST; R. COX; J. D. ROBERTUS. The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Protein Sci*, 9(3):544-51. 2000.
- HOPPINS, S. C.; N. E. GO; A. KLEIN; S. SCHMITT; W. NEUPERT; D. RAPAPORT; F. E. NARGANG. Alternative splicing gives rise to different isoforms of the *Neurospora crassa* Tob55 protein that vary in their ability to insert beta-barrel proteins into the outer mitochondrial membrane. *Genetics*, 177(1):137-49. 2007.
- HU, G.; R. J. ST LEGER. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl Environ Microbiol*, 68(12):6383-7. 2002.
- HURTADO-GUERRERO, R.; D. M. VAN AALTEN. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* chitinase 1 and screening-based discovery of potent inhibitors. *Chem Biol*, 14(5):589-99. 2007.

- INBAR, J.; I. CHET. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiol*, 141 ( Pt 11):2823-9. 1995.
- JANITZ, M. Assigning functions to genes--the main challenge of the post-genomics era. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 159:115-29. 2007.
- JAUQUES, A. K.; T. FUKAMIZO; D. HALL; R. C. BARTON; G. M. ESCOTT; T. PARKINSON; C. A. HITCHCOCK; D. J. ADAMS. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiol*, 149(Pt 10):2931-9. 2003.
- JIN, S. F.; M. G. FENG; J. Q. CHEN. Selection of global *Metarhizium* isolates for the control of the rice pest *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Pest Manag Sci*, 64(10):1008-14. 2008.
- JUAREZ, M. P.; G. C. FERNANDEZ. Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 147(3):711-30. 2007.
- KAAYA, G. P.; D. M. MUNYINYI. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *J Invertebr Pathol*, 66(3):237-41. 1995.
- KARLSSON, M.; STENLID, J. Comparative Evolutionary Histories of the Fungal Chitinase Gene Family Reveal Non-Random Size Expansions and Contractions due to Adaptive Natural Selection. *Evolutionary Bioinformatics*. 4:47–60. 2008.
- KEMPKEN, F.; U. KUCK. *restless*, an active Ac-like transposon from the fungus *Tolyocladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing. *Mol Cell Biol*, 16(11):6563-72. 1996.
- KERSHAW, M. J.; E. R. MOORHOUSE; R. BATEMAN; S. E. REYNOLDS; A. K. CHARNLEY. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J Invertebr Pathol*, 74(3):213-23. 1999.
- KIM, S.; I. MATSUO; K. AJISAKA; H. NAKAJIMA; K. KITAMOTO. Cloning and characterization of the *nagA* gene that encodes beta-n-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(10):2168-75. 2002.



- KORNBLIHTT, A. R. Promoter usage and alternative splicing. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3):262-8. 2005.
- KUPFER, D. M.; S. D. DRABENSTOT; K. L. BUCHANAN; H. LAI; H. ZHU; D. W. DYER; B. A. ROE; J. W. MURPHY. Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell*, 3(5):1088-100. 2004.
- KURANDA, M. J.; P. W. ROBBINS. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 266(29):19758-67. 1991.
- LARRONDO, L. F.; B. GONZALEZ; D. CULLEN; R. VICUNA. Characterization of a multicopper oxidase gene cluster in *Phanerochaete chrysosporium* and evidence of altered splicing of the mco transcripts. *Microbiology*, 150(Pt 8):2775-83. 2004.
- LEAL, J.; F. M. SQUINA; J. S. FREITAS; E. M. SILVA; C. J. ONO; N. M. MARTINEZ-ROSSI; A. ROSSI. A splice variant of the *Neurospora crassa hex-1* transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. *FEBS Lett*, 583(1):180-4. 2009.
- LI, J.; M. G. FENG. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycol Res*, 113(Pt 1):93-9. 2009.
- LI, X.; S. ROSEMAN. The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(2):627-31. 2004.
- LIMON, M. C.; E. MARGOLLES-CLARK; T. BENITEZ; M. PENTTILA. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett*, 198(1):57-63. 2001.
- LODATO, P.; J. ALCAINO; S. BARAHONA; P. RETAMALES; V. CIFUENTES. Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol*, 69(8):4676-82. 2003.
- LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol*, 89(1):19-29. 2005.

- LORITO, M.; S. L. WOO; I. GARCIA; G. COLUCCI; G. E. HARMAN; J. A. PINTOR-TORO; E. FILIPPONE; S. MUCCIFORA; *ET AL.* . Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14):7860-5. 1998.
- LUZ, C.; M. S. TIGANO; I. G. SILVA; C. M. CORDEIRO; S. M. ALJANABI. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(6):839-46. 1998.
- MACARENA, S.; L. L. FERNANDO; V. MONICA; V. RAFAEL; G. BERNARDO. Incomplete processing of peroxidase transcripts in the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Lett*, 242(1):37-44. 2005.
- MACH, R. L.; C. K. PETERBAUER; K. PAYER; S. JAKSITS; S. L. WOO; S. ZEILINGER; C. M. KULLNIG; M. LORITO; C. P. KUBICEK. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl Environ Microbiol*, 65(5):1858-63. 1999.
- MAKETON, M.; P. OROSZ-COGLAN; J. SINPRASERT. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) for control of broad mite *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae) in mulberry. *Exp Appl Acarol*, 46(1-4):157-67. 2008.
- MAMARABADI, M.; B. JENSEN; M. LUBECK. Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. *Curr Genet*, 54(2):57-70. 2008.
- MCCREATH, K. J.; C. A. SPECHT; P. W. ROBBINS. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7):2544-8. 1995.
- MCGUIRE, A. M.; M. D. PEARSON; D. E. NEAFSEY; J. E. GALAGAN. Cross-kingdom patterns of alternative splicing and splice recognition. *Genome Biol*, 9(3):R50. 2008.
- MEDINI, D.; D. SERRUTO; J. PARKHILL; D. A. RELMAN; C. DONATI; R. MOXON; S. FALKOW; R. RAPPUOLI. Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Microbiol*, 6(6):419-30. 2008.

- MEYER, V.; M. ARENTSHORST; A. EL-GHEZAL; A. C. DREWS; R. KOOISTRA; C. A. VAN DEN HONDEL; A. F. RAM. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant. *J Biotechnol*, 128(4):770-5. 2007.
- MILLER, C. D.; D. RANGEL; G. U. BRAGA; S. FLINT; S. I. KWON; C. L. MESSIAS; D. W. ROBERTS; A. J. ANDERSON. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. *Can J Microbiol*, 50(1):41-9. 2004.
- MILLER, P. W.; W. I. DUNN; R. R. SCHMIDT. Alternative splicing of a precursor-mRNA encoded by the *Chlorella sorokiniana* NADP-specific glutamate dehydrogenase gene yields mRNAs for precursor proteins of isozyme subunits with different ammonium affinities. *Plant Mol Biol*, 37(2):243-63. 1998.
- MORAES, C. K.; A. SCHRANK; M. H. VAINSTEIN. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, 46:205-210. 2003.
- NAKAZATO, L.; V. DUTRA; L. BROETTO; C. C. STAATS; M. H. VAINSTEIN; A. SCHRANK. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1*alpha homologous promoter. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(3):521-8. 2006.
- NER, S. S.; M. SMITH. Role of intron splicing in the function of the *MATa1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 9(11):4613-20. 1989.
- NEUVEGLISE, C.; F. CHALVET; P. WINCKER; C. GAILLARDIN; S. CASAREGOLA. Mutator-like element in the yeast *Yarrowia lipolytica* displays multiple alternative splicings. *Eukaryot Cell*, 4(3):615-24. 2005.
- PAL, S.; R. J. ST LEGER; L. P. WU. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, 282(12):8969-77. 2007.
- PEDRAS, M. S.; L. IRINA ZAHARIA; D. E. WARD. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59(6):579-96. 2002.

- PEDRINI, N.; R. CRESPO; M. P. JUAREZ. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 146(1-2):124-37. 2007.
- PINTO JR., H. Genes envolvidos no metabolismo de radicais superóxido no fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre:93. 1994.
- PINTO JR., H. Genes *sod* em *M. anisopliae* e *Aspergillus nidulans*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1998.
- RANGEL, D. E.; G. U. BRAGA; S. D. FLINT; A. J. ANDERSON; D. W. ROBERTS. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *J Invertebr Pathol*, 87(2-3):77-83. 2004.
- RANGEL, D. E.; G. U. BRAGA; A. J. ANDERSON; D. W. ROBERTS. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *J Invertebr Pathol*, 90(1):55-8. 2005a.
- RANGEL, D. E.; G. U. BRAGA; A. J. ANDERSON; D. W. ROBERTS. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J Invertebr Pathol*, 88(2):116-25. 2005b.
- RAO, F. V.; D. R. HOUSTON; R. G. BOOT; J. M. AERTS; M. HODKINSON; D. J. ADAMS; K. SHIOMI; S. OMURA; D. M. VAN AALTEN. Specificity and affinity of natural product cyclopentapeptide inhibitors against *A. fumigatus*, human, and bacterial chitinases. *Chem Biol*, 12(1):65-76. 2005.
- REICHARD, U.; C. Y. HUNG; P. W. THOMAS; G. T. COLE. Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infect Immun*, 68(10):5830-8. 2000.
- REISSIG, J. L.; STORMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem*, 217(2):959-966. 1955.

- ROBERTS, D. W.; R. J. ST LEGER. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol*, 54:1-70. 2004.
- ROY, H. E.; D. C. STEINKRAUS; J. EILENBERG; A. E. HAJEK; J. K. PELL. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu Rev Entomol*, 51:331-57. 2006.
- SAMBROOK, J.; D. RUSSEL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory 2001.
- SAMMETH, M.; S. FOISSAC; R. GUIGO. A general definition and nomenclature for alternative splicing events. *PLoS Comput Biol*, 4(8):e1000147. 2008.
- SHELLENBERG, M. J.; D. B. RITCHIE; A. M. MACMILLAN. Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci*, 33(6):243-6. 2008.
- SCHOLTE, E. J.; B. G. KNOLS; W. TAKKEN. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol*, 91(1):43-9. 2006.
- SCHOLTE, E. J.; W. TAKKEN; B. G. KNOLS. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop*, 102(3):151-8. 2007.
- SCREEN, S. E.; G. HU; R. J. ST LEGER. 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(4):260-6. 2001.
- SEIDL, V.; B. HUEMER; B. SEIBOTH; C. P. KUBICEK. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J*, 272(22):5923-39. 2005.
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev*, 22:36-42. 2008.
- SEXTON, A. C.; B. J. HOWLETT. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryot Cell*, 5(12):1941-9. 2006.

- SHAH, P. A.; J. K. PELL. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(5-6):413-23. 2003.
- SILVA, W.; S. MITIDIERI; A. SCHRANK; M. H. VAINSTEIN. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 40:321-326. 2004.
- SIMS, P. F.; M. S. SOARES-FELIPE; Q. WANG; M. E. GENT; C. TEMPELAARS; P. BRODA. Differential expression of multiple exocellobiohydrolase I-like genes in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol Microbiol*, 12(2):209-16. 1994.
- SINGH, B.; A. DATTA. Regulation of N-acetylglucosamine uptake in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 557(1):248-58. 1979a.
- SINGH, B.; A. DATTA. Induction of N-acetylglucosamine-catabolic pathway in spheroplasts of *Candida albicans*. *Biochem J*, 178(2):427-31. 1979b.
- SINGH, B.; A. DATTA. Regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 583(1):28-35. 1979c.
- SMALL, C. L.; M. J. BIDOCHKA. Up-regulation of Prl, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res*, 109(Pt 3):307-13. 2005.
- SREE, K. S.; V. PADMAJA; Y. L. MURTHY. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Manag Sci*, 64(2):119-25. 2008.
- ST LEGER, R.; R. M. COOPER; A. K. CHARNLEY. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliph vomitoria* and *Manduca sexta*. *J Gen Microbiol*, 133:1371-1382. 1987a.
- ST LEGER, R. J.; A. K. CHARNLEY; R. M. COOPER. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys*, 253(1):221-32. 1987b.
- ST LEGER, R. J.; R. M. COOPER; A. K. CHARNLEY. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. *Arch Biochem Biophys*, 258(1):123-31. 1987c.

- ST LEGER, R.; R. M. COOPER; A. K. CHARNLEY. Characterization of chitinase and chitobioase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol*, 58:415-426. 1991.
- ST LEGER, R.; L. JOSHI; M. J. BIDOCHKA; N. W. RIZZO; D. W. ROBERTS. Biochemical characterization and ultrastructural localization of chitinase produced by *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *App Environ Mircobiol*, 62:907-912. 1996a.
- ST LEGER, R.; L. JOSHI; M. J. BIDOCHKA; D. W. ROBERTS. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13):6349-54. 1996b.
- ST LEGER, R. J.; L. JOSHI; M. J. BIDOCHKA; N. W. RIZZO; D. W. ROBERTS. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl Environ Microbiol*, 62(4):1257-64. 1996c.
- ST LEGER, R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J Invertebr Pathol*, 98(3):271-6. 2008.
- STAATS, C. C. Estudo Funcional de Genes do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.
- STAATS, C. C.; A. JUNGES; M. FITARELLI; M. C. FURLANETO; M. H. VAINSTEIN; A. SCHRANK. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76(4):945-50. 2007.
- STEINBERG, G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell*, 6(3):351-60. 2007.
- SUNG, G. H.; N. L. HYWEL-JONES; J. M. SUNG; J. J. LUANGSA-ARD; B. SHRESTHA; J. W. SPATAFORA. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol*, 57:5-59. 2007.
- TAKAYA, N.; D. YAMAZAKI; H. HORIUCHI; A. OHTA; M. TAKAGI. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Microbiology*, 144 ( Pt 9):2647-54. 1998a.

- TAKAYA, N.; D. YAMAZAKI; H. HORIUCHI; A. OHTA; M. TAKAGI. 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):60-5. 1998b.
- TAVASSOLI, M.; A. OWNAG; S. H. POURSEYED; K. MARDANI. Laboratory evaluation of three strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling *Dermanyssus gallinae*. *Avian Pathol*, 37(3):259-63. 2008.
- TEMPELAARS, C. A.; P. R. BIRCH; P. F. SIMS; P. BRODA. Isolation, characterization, and analysis of the expression of the *cbhII* gene of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 60(12):4387-93. 1994.
- THORSEN, T. S.; A. H. JOHNSEN; K. JOSEFSEN; B. JENSEN. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochim Biophys Acta*, 1764(4):671-6. 2006.
- TIAGO, P. V.; M. H. FUNGARO; M. C. FURLANETO. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. *Lett Appl Microbiol*, 34(2):91-4. 2002.
- TOUNOU, A. K.; C. KOOYMAN; O. K. DOURO-KPINDOU; H. M. POEHLING. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *J Invertebr Pathol*, 97(3):203-10. 2008.
- ULHOA, C. J.; J. F. PEBERDY. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J Gen Microbiol*, 137(9):2163-9. 1991.
- WANG, C.; M. A. TYPAS; T. M. BUTT. Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett*, 213(2):251-5. 2002.
- WANG, C.; G. HU; R. J. ST LEGER. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genet Biol*, 42(8):704-18. 2005a.



- WANG, C.; R. J. ST LEGER. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryot Cell*, 4(5):937-47. 2005b.
- WANG, C.; R. J. ST LEGER. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17):6647-52. 2006.
- WANG, C.; R. J. ST LEGER. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *J Biol Chem*, 282(29):21110-5. 2007a.
- WANG, C.; R. J. ST LEGER. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell*, 6(5):808-16. 2007b.
- WANG, C.; Z. DUAN; R. J. ST LEGER. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell*, 7(2):302-9. 2008.
- WANG, S.; A. LECLERQUE; M. PAVA-RIPOLL; W. FANG; R. J. ST LEGER. Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence associated genes in host specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Eukaryot Cell*. 2009.
- WANG, K.; D. W. USSERY; S. BRUNAK. Analysis and prediction of gene splice sites in four *Aspergillus* genomes. *Fungal Genet Biol*, 46 Suppl 1:S14-8. 2009.
- XU, J. R.; J. E. HAMER. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev*, 10(21):2696-706. 1996.
- YAMAZAKI, H.; A. TANAKA; J. KANEKO; A. OHTA; H. HORIUCHI. *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol*, 45(6):963-72. 2008.
- YANG, J.; B. TIAN; L. LIANG; K. Q. ZHANG. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(1):21-31. 2007.

- YANG, Y.; S. CAI; Y. ZHENG; X. LU; X. XU; Y. HAN. *Metarhizium taii* var. *chongqingensis* Nov., Anamorph of *Cordyceps chongqingensis* sp. Nov. Isolated from a Low Altitude Area in Chongqing, China. *Curr Microbiol*, 2009.
- YE, D.; C. H. LEE; S. F. QUEENER. Differential splicing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase pre-mRNA. *Gene*, 263(1-2):151-8. 2001.
- YI LIU, Z.; Z. Q. LIANG; A. J. WHALLEY; Y. J. YAO; A. Y. LIU. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J Invertebr Pathol*, 78(3):178-82. 2001.
- YU, J. H.; Z. HAMARI; K. H. HAN; J. A. SEO; Y. REYES-DOMINGUEZ; C. SCAZZOCCHIO. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 41(11):973-81. 2004.
- ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. *Can J Microbiol*, 17(4):525-9. 1971.
- ZEES, A. C.; S. PYRPASSOPOULOS; C. E. VORGIAS. Insights into the role of the (alpha+beta) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of chitinase A from *Serratia marcescens*. *Biochim Biophys Acta*, 1794(1):23-31. 2009.
- ZEILINGER, S.; C. GALHAUP; K. PAYER; S. L. WOO; R. L. MACH; C. FEKETE; M. LORITO; C. P. KUBICEK. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet Biol*, 26(2):131-40. 1999.
- ZHAO, H.; A. K. CHARNLEY; Z. WANG; Y. YIN; Z. LI; Y. LI; Y. CAO; G. PENG; Y. XIA. Identification of an extracellular acid trehalase and its gene involved in fungal pathogenesis of *Metarizium anisopliae*. *J Biochem*, 140(3):319-27. 2006.

## ANEXOS

## ANEXO I

**Artigo: Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.** Autoria: César Milton Baratto, Valéria Dutra, Juliano Tomazzoni Boldo, Leonardo Barbosa Leiria, Marilene Henning Vainstein e Augusto Schrank. *Current Microbiology*, 53:217-221. 2006.

## Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

César Milton Baratto,<sup>1</sup> Valéria Dutra,<sup>1</sup> Juliano Tomazzoni Boldo,<sup>1</sup> Leonardo Barbosa Leiria,<sup>1</sup> Marilene Henning Vainstein,<sup>1,2</sup> Augusto Schrank<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Received: 16 February 2006 / Accepted: 5 April 2006

**Abstract.** *Metarhizium anisopliae* infects arthropods via a combination of specialized structures and cuticle degradation. Hydrolytic enzymes are accepted as key factors for the host penetration step and include chitinases. The characterization of the *chi2* chitinase gene from *M. anisopliae* var. *anisopliae* is reported. The *chi2* gene is interrupted by two short introns and is 1,542-bp long, coding a predicted protein of 419 amino acids with a stretch of 19 amino acid residues displaying characteristics of signal peptide. The predicted chitinase molecular mass is 44 kDa with a mature protein of 42 kDa and a theoretical pI of 4.8. The comparison of the CHI2 predicted protein to fungal orthologues revealed similarity to the glycohydrolase family 18 and a phylogenetic analysis was conducted. The *chi2* gene is up-regulated by chitin as a carbon source and in conditions of fungus autolysis, and is down-regulated by glucose. This regulation is consistent with the presence of putative CreA/Crel/Crr1 carbon catabolic repressor binding domains on the regulatory sequence.

*Metarhizium anisopliae* is a well-known, broad-range arthropod pathogen, which is applicable in the biological control of several insect pests, including vectors for human diseases, and ticks [13, 14, 16]. During fungal penetration through the host cuticle, hydrolytic enzymes such as proteases, chitinases, and lipases are produced and secreted and are proposed to be important for the initiation of the infection process, leading to cuticle transposition [28]. This range of extracellular enzymes that degrade the components of the host cuticle is produced when *M. anisopliae* is grown in arthropod cuticle or chitin as the sole carbon and nitrogen source [3, 18]. Chitinases are among these extracellular enzymes and some have been purified and characterized [15, 23, 29].

In fungi, chitinases have a physiological role in hyphal growth and morphogenesis [30] and have also been shown to be produced during host infection by entomopathogenic fungi [8]. Analysis of secreted chitinases in *M. anisopliae* revealed at least six isoforms (30, 33, 43.5, 45, 60, and 110 kDa) and only one has both the protein and the gene isolated and characterized (*chi3* gene and CHIT30 chitinase) [8]. Three genes coding for chitinases were described in *Metarhizium*: *chit1* gene and the ortholog *chi1*, code a 42-kDa endochitinase [2, 5, 26]; *chi2* (partial sequence, AJ293217); and, *chi3*, which codes for an endo/exo-acting 30-kDa chitinase (CAC07217.1) [8]. However, the role of chitinases in arthropod pathogenesis is still not completely understood.

One approach to understand their function is the isolation of chitinase genes and the evaluation of their overexpression in bioassays. Thus, the overexpression of

the *M. anisopliae* *chit1* gene did not show altered pathogenicity to *Manduca sexta* [26]. In contrast, the *M. anisopliae* CHIT30 chitinase (*chi3* gene) was shown to be produced during tick infection [8] and the overexpression of a *Beauveria bassiana* chitinase, gene *Bbchit1*, enhanced the virulence for aphids [12]. These three chitinases, CHIT1, CHIT30, and *Bbchit1*, share very low levels of similarity and da Silva et al. [8], analyzing the sequences from chitinases whose function in cell morphogenesis/growth or in pathogenesis was assigned, showed that chitinases with similar cellular roles may diverge in sequence. In *Metarhizium*, only one of the chitinase genes, the *chit1* gene, was fully characterized [5]. For genes *chi2* (AJ293217) and *chi3* (AJ293218), only ESTs sequences are deposited.

Aiming to contribute to the investigation of the role of *Metarhizium* chitinase genes in the host infection process, we isolated and characterized the genomic and cDNA copies of the *chi2* ortholog from *M. anisopliae* var. *anisopliae*. We also studied its transcription regulation under different culture conditions, including the use of host cuticle as a carbon/nitrogen source.

## Materials and Methods

**Organisms and growth conditions.** *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E6 from the Microbial Genetics Group (Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, USP, Brazil) was maintained in complete Cove's medium (MCC) media as previously described [9]. For RNA extraction, the fungus was grown in liquid Cove's medium [9] with NaNO<sub>3</sub> 0.6%, supplemented with glucose (1%), *N*-acetylglucosamine, GlcNAc, (0.1%), *Boophilus microplus* cuticle (1%) [9], or chitin (0.8%). *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used for genomic library construction and propagation of pUC18 plasmid and clones. Bacterial cultivation was in LB agar or LB broth [24].

**Southern hybridization and library construction.** Genomic DNA from *M. anisopliae* was extracted from mycelium [4] and (10 µg) digested with BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, or XbaI restriction endonucleases and fractionated on 0.8% agarose gel electrophoresis. The DNA was transferred to nylon blotting membrane Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>, probed with a 615-bp amplicon from *chi2* gene and hybridized using the ECL kit. The probe was generated using primers (Chi2F-GTGTTGGCCTTGTTGGCCTG and Chi2R-TACTGGCCAATTTGCTCGGC) (Invitrogen, São Paulo, Brazil) based on the reported ortholog *chi2* gene partial sequence from *M. anisopliae* var. *acridum* [AJ293217].

**Nucleotide sequencing and computational analysis.** Inserts and amplicons were sequenced at the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) in an ABI-PRISM3100 Genetic Analyzer and analyzed by Blast using the NCBI server at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> [1]. SignalScan Program (at <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) was used to find a putative signal peptidase cleavage site. Chitinase amino acid sequences from fungi (CAC07216.1; AAB81998; AAN41259.1; CAG86633.1; EAL03025.1; EAL00460; CAG62749.1; BAA36223.1;

AAS55554; NP\_013388; AAA92642.1) were aligned using ClustalX [31] and a phylogenetic tree was constructed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software [19] by the neighbor-joining method. Phylogenetic tree architecture confidence was evaluated by 10,000 bootstrap replications.

**RT-PCR analysis and characterization of transcription start site.** Total RNA extraction was performed as described [9]. First-strand cDNA synthesis was performed with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol with oligo dT as primer, using 1 µg of RNA. Amplification of the *chi2* gene transcripts was performed as described above and RNA quantity was normalized by the amplification of *tefl-α* gene [21]. Amplicons were resolved by electrophoresis in 1.0% agarose gel. For isolation and characterization of 5' ends from the *chi2* gene, a 5' RACE System was used (Version 2.0, Invitrogen), with 1 µg of RNA extracted from mycelium grown for 48 h with chitin as carbon source. Primers were Chi2R (see above) and an antisense primer (Chi2IR-GAATTGGGTTGGCAGTAC). The amplified product was purified and sequenced.

## Results and Discussion

In order to clone the *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E6 complete *chi2* gene sequence, PCR fragments were amplified (615 bp in size) using primers derived from the previously reported ortholog *M. anisopliae* var. *acridum* *chi2* gene [AJ293217]. A recombinant clone with a 5.3-kb insert encompassing the *chi2* gene was selected by colony hybridization from about 1,000 colonies from a plasmid library carrying *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E6 genomic DNA. The complete nucleotide sequence of the *chi2* gene was determined (DQ011663) and the 419 amino acid residue ORF (CHI2) shows high similarity (97%) to the putative chitinase ortholog from *M. anisopliae* var. *acridum* [AJ293217]. The transcription initiation site was determined by sequencing a 311-bp cDNA amplicon generated by 5' RACE reaction. The transcription initiation (G + 1) was identified and the ATG start codon was positioned at 95 bp from the transcription initiation site. The transcription initiation environment is ACATCAAG, which is similar to the consensus TCATCANC [10]. The *chi2* gene is 1,542 bp long and is interrupted by two introns (210 and 72 bp long). In silico analysis of the 5' flanking region revealed canonical CAAT and TATAA putative controlling elements at the appropriate distances. In addition, a consensus motif was found for the CreA/Crel/Crr1 carbon catabolic repressor, a negative regulator mediating carbon catabolism repression in *A. nidulans* and *M. anisopliae* (Fig. 1) [7, 25, 31].

Chitinase CHI2 has a predicted molecular mass of 44 kDa and a putative signal peptidase cleavage site at V<sup>19</sup>, rendering a mature protein of 42 kDa with theoretical pI of 4.8. A chitinase with a similar molecular mass is coded by the *chit1* gene from *M. anisopliae* var. *anisopliae* (CHIT42 endochitinase, AF027498) [2].

```

ggcaagacatcagatcctcgtgcccgacaaggccaatgaaaccactcaagccaacgcaggaacattcaac 70
tctcaggaacgcatcagctagtcocctgcaaaaaccccccacggaatggccgatagcttacacggcaaaagc 140
gactacgggttctcggcacgcgctgtgctcctcatgttgtcactcgcgctcctcogagctcgtcacggggag 210
gcaattgaagatggatgacacagcttcattcctgtccatgcaacgctcctcctaaacggtggtgtct 280
cgcgctcctcagctcgccaatgcccgtccacgctgctgacttgggagcttggatgtagccgggtcctc 350
gtgctgctggatggatgagtggttggaaaatgatatataacaggccccaattaactcgggatggaacggcca 420
tgtattgccacatcaagttggtagttgagcttgtgtatattctctcacttctctgtacatgttacatct 490
ttatattgtgtatatcatcgatATG

```

Fig. 1. *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E6 *chi2* gene 5' flanking sequence. Capitalized letters mark the first ATG. Putative CAAT and TATAA sequences and a putative CREA element (CCCCAC) are underlined. The transcription start site is shown in bold and the conserved transcription initiation sequence is shaded.

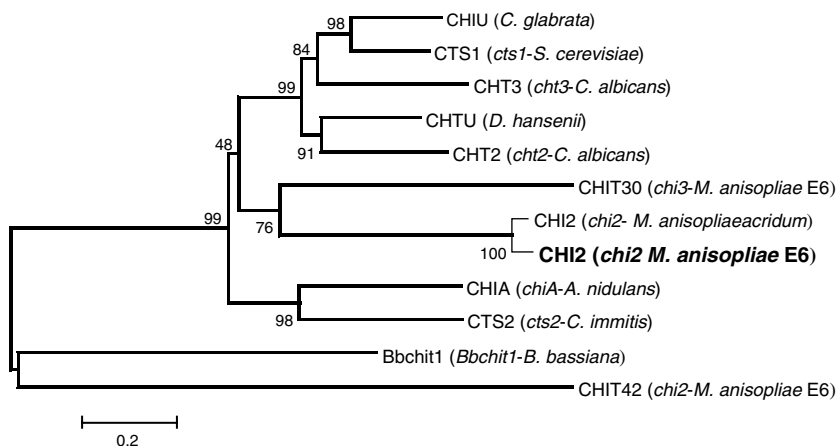


Fig. 2. Phylogenetic neighbor-joining tree of *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E6 *chi2* deduced amino acid sequences. Tree confidence was confirmed by 10,000 bootstraps and the numbers on the branches represent values for the bootstrap. The scale bar indicates the number of amino acid substitutions. For the GenBank accession number for the chitinase sequences analyzed, see Materials and Methods.

However, there is very little amino acid identity between the two chitinases (CHIT42 and CHI2) and their theoretical pIs differ (Fig. 2) [5, 26].

The comparison of the predicted CHIT2 chitinase to fungal orthologs revealed a similarity to the glycohydrolase family 18 [Pfam database; 11]. The consensus motif SXGG corresponding to a substrate-binding site was identified; however, the catalytic domain consensus motif (D1XXD2XD3XE), highly conserved among fungal chitinases [22, 25], has one amino acid substitution (D1 → N) in the CHI2 sequence. A characteristic fungal-type cellulose-binding domain (CBD) present in the *chi2* C-terminal sequence is similar to that of the 33-kDa chitinase gene in *Trichoderma virens*, predicted to encode a protein C-terminus with homology to the conserved family I cellulose-binding domain [17]. Apparently, the CBD in endochitinases increases hydrolytic activity towards insoluble substrates such as chitin-rich fungal cell walls in *Trichoderma harzianum* strains [20].

In order to evaluate the evolutionary relationships and to classify the predicted chitinase CHIT2 into bacterial-like or plant-like classes, a neighbor-joining phylogenetic tree was constructed. As shown in Figure 2, the tree collapsed in two clusters, one encompassing *Metarhizium* CHIT2 orthologues and CHIT30, as a plant-like class, and the other cluster with CHIT42 (coded by *chit1* gene), a bacterial-like chitinase [8].

Previously, we reported the effect of different carbon sources on both total chitinase synthesis and secretion in *M. anisopliae* and the dual regulation depending on the GlcNAc concentration in the culture medium [3, 5, 18, 23]. To investigate the regulation of the *chi2* gene, RT-PCR was conducted using RNA extracted from cultures amended with different carbon sources: 1% glucose, 0.1% GlcNAc, 1% tick cuticle, or 0.8% chitin. In glucose-added cultures, the sugar was supplemented every 24 hours to ensure its availability throughout fungal growth. The primers were targeted to a region spanning the first intron of the *chi2* gene, generating an amplicon of 402 bp when cDNA was used as template for amplification, and a 615-bp amplicon for genomic DNA. To normalize RNA quantities, a 1,031-bp amplicon generated by primers directed to the *tef 1-α* gene (AY445082) was used. As shown in Figure 3, after 48 h *M. anisopliae* culture, *chi2* gene transcripts were only detected when chitin was the carbon source. After 72 h, *chi2* gene transcripts were also detected in cultures in the presence of GlcNAc or tick cuticle whilst transcripts were still not detected in the presence of glucose. Similar results were reported for the *chit36* gene from *T. harzianum* [32] and for the *Bchit1* gene from *B. bassiana* [12]. In early cultures (18 or 30 h), *chi2* gene transcripts were not detected (data not shown). In cultures with 0.1% GlcNAc, the *chi2* gene transcripts were only detected after 72 hours of

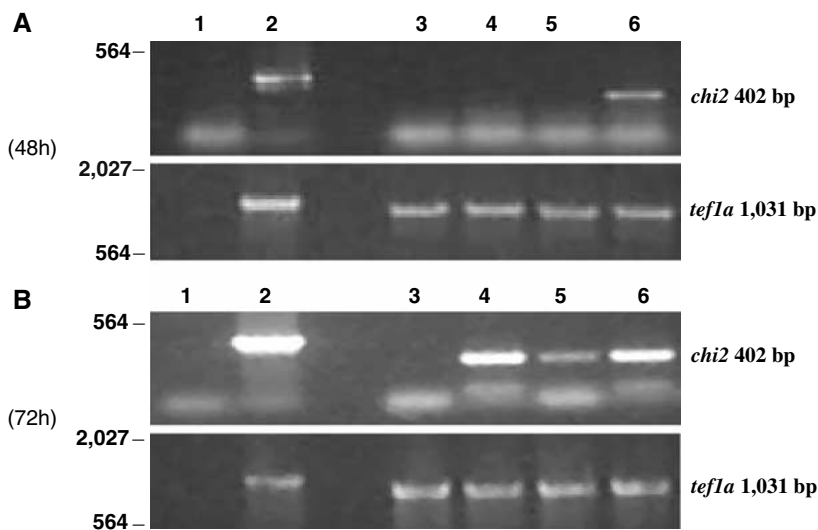


Fig. 3. RT-PCR of *chi2* gene transcripts in different culture conditions. *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E6 was cultured for 48 h (A) or 72 h (B). Upper gel in each panel represents *chi2* gene transcripts. Lower gel in each panel represents *tef1 $\alpha$*  gene transcripts, used to normalize RNA quantity. Numbers at the left represent size in bp. Numbers at the right represent the amplicon size in bp. Lanes: (1) control with no template added; (2) genomic DNA from gene *chi2* template, resulting in a 615-bp product; RNA from cultures in minimal medium added of: (3) 1% glucose; (4) 0.1% GlcNAc; (5) 1% tick cuticle; (6) 0.8% chitin. cDNA amplicon from *chi2* gene is 402 bp long.

fungal growth, when the amino sugar was exhausted. This suggests that the expression of *chi2* gene may be triggered by autolysis. Similar results were described for the *ech42* gene that encodes chitinase ECH42 in *T. harzianum*, in which significant *ech42* expression was detected only after prolonged carbon starvation [6]. In tick cuticle and chitin, the *M. anisopliae chi2* gene transcription was induced, indicating that synthesis is subject to regulation by the substrate.

In fungi, chitinases have a physiological role in hyphal growth and morphogenesis. The relevance of chitinase production and secretion during the penetration of host cuticle by fungal pathogens is not fully understood. To date the exo/endochitinase CHIT30 of *M. anisopliae* strain E6 was shown to be present during *B. microplus* infection [8] and only the *chit1* and *Bbchit1* chitinase genes, from *M. anisopliae* and *B. bassiana*, respectively, have been investigated in the insect fungus pathogenic context. The CHIT42 (*chit1* gene) chitinase from *M. anisopliae* was shown to have no effect on virulence to insects [26], while overproduction of *Bbchit1* did increase the virulence of *B. bassiana* for aphids [12].

Seidl et al. [27] showed that both *chi2* and *chi3* genes from *Metarhizium* are related to chitinase genes from mycoparasites (*Trichoderma*) and to no other chitinases described in all other ascomycetous genomes. The authors suggest that these chitinases probably have special functions in host chitin degradation during parasitism. Indeed, the related *Hypocrea jecorina* (anamorph: *Trichoderma reesei*) chitinase gene *chi18-13* is up-regulated in the presence of host cell wall [27] as is the *Metarhizium chi2* gene in the presence of host cuticle (Fig. 3B).

The cloning and characterization of the chitinase genes is important to elucidate the relationships be-

tween chitinases and virulence in insects/ticks or in the fungus morphogenesis. In situ immunodetection of the protein and overexpression and gene silencing experiments are necessary to elucidate its biological role in *Metarhizium*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PADCT (Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior). We thank Irene Schrank for a critical reading of the manuscript and Giancarlo Pasqualli for the use of sequencing facilities.

#### Literature Cited

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Baratto CM, da Silva MV, Santi L, Passaglia L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A (2003) Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 49:723–726
- Barreto CC, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr Microbiol* 48:102–107
- Bogo MR, Queiroz MV, Silva DM, Gimenez Pecci MP, Azevedo JL, Schrank A (1996) Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 100:1468–1472
- Bogo MR, Rota CA, Pinto H, Jr., Ocampos M, Correa CT, Vainstein MH, 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
- Carsolio C, Gutierrez A, Jimenez B, Van MM, Herrera-Estrella A (1994) Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum*



- endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proc Natl Acad Sci USA 91:10903–10907
7. Cubero B, Scazzocchio C (1994) Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. EMBO J 13:407–415
  8. da Silva MV, Santi L, Staats CC, da Costa AM, Colodel EM, Driemeier D, Vainstein MH, Schrank A (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. Res Microbiol 156:382–392
  9. Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Silveira SI, Henning VM, 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 155:245–251
  10. Eberle J, Russo VE (1994) *Neurospora crassa* blue light-inducible gene bli-3. Biochem Mol Biol Int 34:737–744
  11. Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A (2002) The PROSITE database, its status in 2002. Nucleic Acids Res 30:235–238
  12. Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Appl Environ Microbiol 71:(1)363–370
  13. Frazzon AP, da Silva VJI, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet Parasitol 94:117–125
  14. Gillespie JP, Bateman R, Charnley AK (1998) Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. J Invertebr Pathol 71:128–137
  15. Kang SC, Park S, Lee DG (1999) Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol 73:276–281
  16. Kanzok SM, Jacobs-Lorena M (2006) Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. Trends Parasitol 22:49–51
  17. Kim DJ, Baek JM, Uribe P, Kenerley CM, Cook DR (2002) Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. Curr Genet 40:374–384
  18. Krieger de MC, Schrank A, Vainstein MH (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. Curr Microbiol 46:205–210
  19. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics 17:1244–1245
  20. Limon MC, Chacon MR, Mejias R, gado-Jarana J, Rincon AM, Codon AC, Benitez 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
  21. Nakazato L, Dutra V, Broetto L, Staats CC, Vainstein MH, Schrank A (2006) Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1* alpha homologous promoter. Appl Microbiol Biotechnol 10:1–8
  22. 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
  23. Pinto AS, Barreto CC, Schrank A, Ulhoa CJ, Vainstein MH (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*. Can J Microbiol 43:322–327
  24. Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
  25. Screen S, Bailey A, Charnley K, Cooper R, Clarkson J (1997) Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. Curr Genet 31:511–518
  26. Screen SE, Hu G, St. Leger RJ (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 Invert Pathol 78:260–266
  27. Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP (2005) A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. FEBS J 272:5923–5939
  28. St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. J Invert Pathol 47:295–302
  29. St. Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1991) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J Invert Pathol 58:415–426
  30. Takaya N, Yamazaki D, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M (1998) Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. Biosci Biotechnol Biochem 62:60–65
  31. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25:4876–4882
  32. 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

## ANEXO II

**Artigo: The endochitinase *chi2* gene of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence towards the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*.** Autoria: Juliano Tomazzoni Boldo, Ângela Junges, Karina Bohrer do Amaral, Charley Christian Staats, Marilene Henning Vainstein e Augusto Schrank. Artigo publicado no periódico *Current Genetics*, DOI 10.1007/s00294-009-0267-5.

# Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*

Juliano Tomazzoni Boldo · Angela Junges ·  
Karina Bohrer do Amaral · Charley Christian Staats ·  
Marilene Henning Vainstein · Augusto Schrank

Received: 5 June 2009 / Revised: 15 July 2009 / Accepted: 16 July 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Chitinases have been implicated in fungal cell wall remodeling and play a role in exogenous chitin degradation for nutrition and competition. Due to the diversity of these enzymes, assigning particular functions to each chitinase is still ongoing. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* produces several chitinases, and here, we evaluate whether endochitinase CHI2 is involved in the pathogenicity of this fungus. We constructed strains either overexpressing or lacking the CHI2 chitinase. These constructs were validated by Southern, Northern and Western blot analysis, and chitinase production. To access the effects of CHI2 chitinase in virulence, the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* was used as a host. CHI2 overexpression constructs showed higher efficiency in host killing suggesting that the production of this chitinase by a constitutive promoter reduces the time necessary to kill the insect. More significantly, the knock out constructs showed decreased virulence to the insects as compared to the wild type strain. The lack of this single CHI2 chitinase diminished fungal infection efficiency, but not any other detectable trait, showing that the *M. anisopliae* family 18, subgroup B endochitinase CHI2 plays a role in insect infection.

**Keywords** Chitinase · Overexpression · Gene knock out · Agrotransformation · *Metarhizium anisopliae* · *Dysdercus peruvianus*

## Introduction

Chitin is the major structural component of the invertebrate exoskeleton, and is an important component of the cell wall of filamentous fungi. This polysaccharide is an abundant linear insoluble polymer and is produced by a number of organisms. It is composed of several units of the acetylated amino sugar *N*-acetylglucosamine linked by  $\beta$ -1,4 bonds and is generated to provide stiffness to structures where it is deposited due to the rigidity of the polymer and by forming crosslinks in chitin fibers (Seidl 2008). In addition, it provides protective functions, acting as an initial barrier to hostile environments. In filamentous fungi, the rigid structure formed by chitin and other polysaccharides, which together represent almost 90% of the cell wall, is also useful for penetration of the hyphae into insoluble substrates for nutrition (Latge 2007). Fungi and other microorganisms can also use chitin as an exogenous carbon and nitrogen source and are, therefore, the main recyclers of this abundant polymer, second only to cellulose (Duo-Chuan 2006).

The enzymes that can fully degrade chitin into *N*-acetylglucosamine monomers are divided into *N*-acetylglucosaminidases [EC3.2.1.52, Glycoside hydrolase (GH) family 20] and chitinases (EC3.2.1.14, GH family 18 and 19). *N*-acetylglucosaminidases catalyze the release of GlcNAc monomers from GlcNAc dimers or from the non-reducing terminal end of GlcNAc multimers. Chitinases can be classified into two major classes: endochitinases that cleave the chitin polymer at any point inside the fiber and exochitinases that cleave from the non-reducing end of the polymer

Communicated by U. Kueck.

J. T. Boldo · A. Junges · K. B. do Amaral · C. C. Staats ·  
M. H. Vainstein · A. Schrank (✉)  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular  
(PPGBCM), Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), Av. Bento Gonçalves,  
9500, Bloco IV, Prédio 43-421, Bairro Agronomia, Porto Alegre,  
Rio Grande do Sul CEP 91501-970, Brazil  
e-mail: aschrank@cbiot.ufrgs.br

and release *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) dimers. All fungal chitinases analyzed so far (including all of the available fungal genomes) belong to GH family 18. Current classification divides GH family 18 chitinases into three subgroups. Subgroup A (former class V) chitinases contain catalytic domain, but no carbohydrate-binding module (CBM), and have molecular mass ranging from 40 to 50 kDa. Most of these chitinases possesses N-terminal signal peptide and are targeted to the secretory pathway, with some exceptions that have intracellular localization. Chitinases from subgroup B (former class III) also possesses N-terminal signal peptide and vary greatly in size, varying from 30 to 90 kDa. Smaller subgroup B chitinases contain a CBM, traditionally described as cellulose-binding domain (CBD), which has a broader polysaccharide binding spectrum and can also bind chitin. Larger subgroup B chitinases usually have serine/threonine rich domains and/or GPI-anchoring signal so that the mature proteins are bound to the plasma membrane. Subgroup C is composed by large chitinases that have a molecular mass of 140–170 kDa. They have N-terminal signal peptide and several features that distinguish them from other subgroups, like the peptidoglycan-binding regions. Filamentous fungi are prolific chitinase producers in terms of both quantity and variety. These enzymes have been implicated in many aspects of fungal biology such as conidial germination, hyphal growth and morphogenesis; in defense against niche competitors; and in nutrition by solubilizing exogenous chitin fibers (Seidl 2008).

Considering the participation of chitinases in nutrition, it is important to emphasize the lifestyle acquired by some filamentous fungi through evolution. Several filamentous fungi such as *Metarhizium anisopliae* have specialized in the acquisition of energy by penetrating and colonizing terrestrial arthropods, whose cuticle is composed of almost 30% chitin fibers (Duo-Chuan 2006). To acquire nutrients in nature, the entomopathogenic fungi have developed a complex infection process, involving mechanical pressure exerted by appressorium formation and the secretion of hydrolases, including chitinases (da Silva et al. 2005; Pedrini et al. 2007; Qazi and Khachatourians 2007; Wang and St Leger 2007). Until now, however, only one *M. anisopliae* chitinase has been experimentally shown to participate in the infection process (da Silva et al. 2005). *M. anisopliae* chitinases are induced in vitro when the fungus is grown in chitin-containing medium (Krieger de Moraes et al. 2003; Barreto et al. 2004; Baratto et al. 2006; da Silva et al. 2005). At least six chitinases have been detected, although only three genes have been isolated (Bogo et al. 1998; Freimoser et al. 2003; Baratto et al. 2006). The *chit1* gene encodes a 42-kDa endochitinase (Bogo et al. 1998; Baratto et al. 2003); the *chi2* gene also encodes a 42-kDa endochitinase (Baratto et al. 2006); and

the *chi3* gene encodes a 30-kDa exo/endo-acting chitinase (Pinto et al. 1997; Freimoser et al. 2003; da Silva et al. 2005). Although chitinases are induced by chitin and host cuticle-containing media, the importance of these enzymes in the pathogenesis process is still unclear. The evaluation of constructs carrying deletions or overexpressing chitinase in bioassays could help the understanding of their function.

Few studies have been conducted to analyze whether chitinases participate in the infection process of entomopathogenic fungi. The overexpression of the *M. anisopliae chit1* gene did not alter fungal virulence toward *Manduca sexta* (Screen et al. 2001). In contrast, *M. anisopliae* CHIT30 chitinase (*chi3* gene) was found to be highly expressed during *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection (da Silva et al. 2005), and the overexpression of the *Beauveria bassiana* endogenous *Bbchit1* gene enhanced fungal virulence toward aphids (Fan et al. 2007).

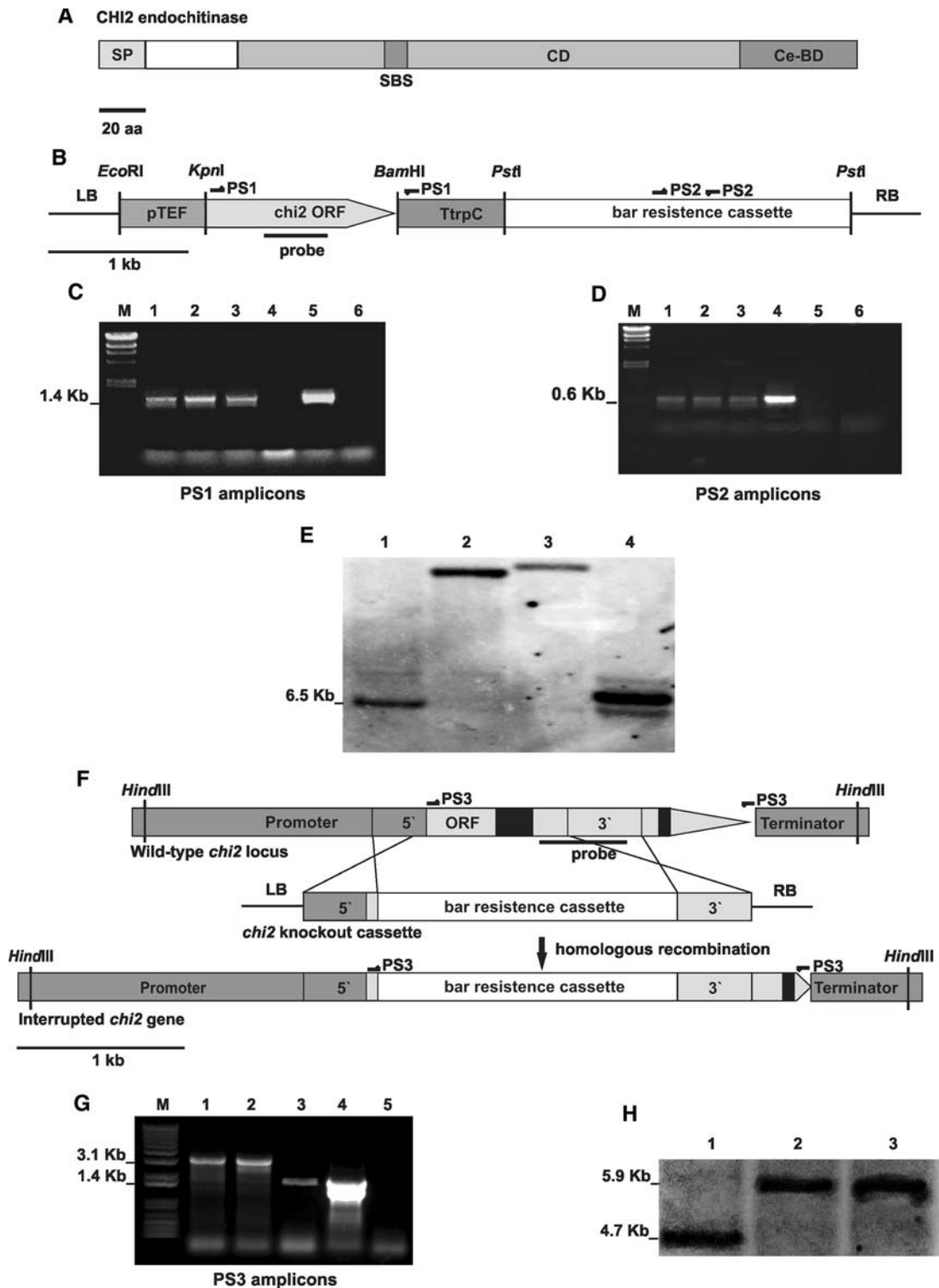
The *M. anisopliae chi2* gene was cloned from strain E6 (used as the wild-type strain in this work) and characterized (Baratto et al. 2006). The *chi2* gene comprises 1,524 bp, including two introns of 210 and 72 bp. The endochitinase encoded by this gene has a predicted size of 423 aa and a predicted mass of 42 kDa. CHI2 possesses a catalytic domain containing a substrate binding site and a fungal CBD at the C-terminus, as well a signal-peptide at the N-terminus, which is characteristic of GH family 18 subgroup B (Fig. 1a). Phylogenetically, the CHI2 chitinase clusters with the CHIT30 chitinase and other family 18 plant-like chitinases, subgroup B (Seidl et al. 2005). As suggested by Seidl et al. (2005), the *chi2* and *chi3* genes are related to mycoparasite chitinases since those chitinases clustered as a separated clade within subgroup B chitinases and potentially have a role in myco- and entomopathogenicity processes. Consistently, both *chi2* and *chi3* genes from *M. anisopliae*, as well as *chi18-13* from the mycopathogen *Trichoderma harzianum*, are upregulated in the presence of host cuticle (da Silva et al. 2005; Seidl et al. 2005; Baratto et al. 2006).

In order to assign a function to the *M. anisopliae* CHI2 chitinase, we constructed *chi2* overexpressing and knock out constructs and evaluated their virulence to insects.

## Materials and methods

### Plasmid constructs

For the construction of the CHI2 overexpression plasmid, a cDNA of the *chi2* gene from *M. anisopliae* (Baratto et al. 2006) was amplified using specific primers [*chi2*cDNAF: 5' GGTACCAATGCATCATCTACGCGCTC 3' (*Kpn*I site underlined); *chi2*cDNA R: 5' GGATCCCACCGGCATGACGACCACCA 3' (*Bam*HI site underlined)] and blunt



**Fig. 1** Overexpression and knock out constructs. **a** CHI2 domain prediction. *SP* signal peptide; *CD* glycosyl hydrolases family 18 catalytic domain; *SBS* substrate binding site; *Ce-BD* fungal cellulose binding domain. **b** Overexpression cassette. **c** Overexpression transformants screened using PS1 primers: 1 T5; 2 T12; 3 T33; 4 E6; 5 positive control (pPZP::upchi2::bar plasmid); 6 no DNA template control. **d** Overexpression transformants screened using PS2 primers: 1 T5; 2 T12; 3 T33; 4 positive control (plasmid pPZP::upchi2::bar); 5 E6; 6 no DNA

template control. **e** Southern blot analysis of the overexpression transformants: 1 E6; 2 T5; 3 T12; 4 T33. **f** Knock out cassette and schematic genome integration. **g** Knock out transformants screened using PS3 primers: 1 Δ22; 2 Δ25; 3 E6; 4 positive control (pPZP:: Δchi2::bar plasmid); 5 no DNA template control. **h** Southern blot analysis of the knock out cassettes: 1 E6; 2 Δ22; 3 Δ25. *PS* primer sets used for transformants screening PCR; *LB* binary vector left border; *RB* binary vector right border

cloned into the pUC18 *Sma*I site, generating the pUC::upchi2 plasmid. This plasmid was then digested with *Kpn*I and *Bam*HI restriction enzymes, and the *chi*2 ORF was subcloned into the pTEF/TRPC plasmid digested with *Kpn*I and *Bam*HI (Nakazato et al. 2006), which contained the *M. anisopliae* *tef1- $\alpha$*  gene constitutive promoter and the *Aspergillus nidulans* *trpc* gene terminator. The pPZP2 01BK binary plasmid (Covert et al. 2004) was digested with *Eco*RI and *Hind*III, and the overexpression cassette of the *chi*2 gene was inserted, generating the pPZP::upchi2 plasmid. The pPZP::upchi2 plasmid was digested with *Pst*I, and the resistance cassette carrying the *bar* gene, which confers resistance to the fungicide ammonium glufosinate (Nakazato et al. 2006), was inserted, generating the pPZP::upchi2::bar plasmid. The plasmid used to knock out the *M. anisopliae* *chi*2 gene was constructed using fusion PCR methodology (Yu et al. 2004). The 5' portion of the *chi*2 gene, including 520 bp of the promoter region and 140 bp of the coding region, was amplified using primers 5CHI2F (5' GCAAGACATCAGATCCTCGTGCCC 3') and 5CHI2R (5' AGTCACCGGTCACGTGTACAGCAGTAGACGACATTTT 3'). The 3' portion of the *chi*2 gene, comprising 632 bp of the coding region, was amplified using primers 3CHI2F (5' CATGCTCCTCTTCTTTACTCTCGACATTGAAGTCAA 3') and 3CHI2R (5' AAGATGGCATCGTGGTCGCG 3'). The 5CHI2R and 3CHI2F primers span the 5' and the 3' ends of a resistance cassette expressing the *bar* gene. Both PCR products were purified and used for PCR in a mix containing the resistance cassette and primers 5CHI2F and 3CHI2R. The expected product of 3.3 kb was purified and blunt cloned into the pPZP201BK vector, generating the pPZP:: $\Delta$ chi2::bar plasmid.

#### *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

*Metarhizium anisopliae* transformation mediated by *A. tumefaciens* was carried out as previously reported (Staats et al. 2007). Positive transformants were screened by PCR.

#### Southern blot analysis

According to PCR results, both overexpressing and knock out transformants were selected for Southern blot assays to further characterize cassette integration into the *M. anisopliae* genome. The selected transformants were grown on Mcc media (Cove 1966) to obtain mycelia. The mycelia were grounded, and genomic DNA was extracted using standard protocols (Sambrook and Russel 2001). DNA samples were digested with the appropriate restriction endonucleases and subjected to electrophoresis in a 1.2% agarose gel for 16 h at 1 V cm<sup>-1</sup>. After electrophoresis, the

samples were electroblotted onto nylon membranes using a Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) and baked at 80°C for 2 h. A *chi*2 gene probe (comprising nt 683–1185 (503 bp) of the *chi*2 gene ORF—accession number DQ011663.2; Fig. 1b) was labeled with <sup>32</sup>P and hybridized for 16 h at 60°C. Gradual stringency washes were performed, and the membrane was exposed to the Kodak-K Screen. Digital images of the blots were obtained using the Pharos system (Bio-Rad).

#### Anti-serum production

To raise the anti-CHI2 polyclonal anti-serum, the coding region of the *chi*2 gene was amplified using primers chi2\_S\_EC (5' CCATGGATCATCTACGCGCTCTCGTCG 3') and chi2\_A\_EC (5' CTCGAGCCGGCATGACGACCACCAAT 3'). The amplified product was blunt cloned into the pUC18 *Sma*I site. The pET-23d(+) vector was digested using *Nco*I and *Xho*I restriction enzymes, and the *chi*2 coding region was subcloned. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS (Stratagene) cells for heterologous expression. Cells were cultivated on LB media containing 1% glucose for 2 h, and expression was induced by 0.1 M IPTG for 3 h. Cells were harvested by centrifugation, and expression was analyzed by SDS-PAGE. The recombinant protein was partially purified using a Hi-Trap chromatography column (GE Healthcare) following solubilization in 6 M urea. The eluted fraction with the recombinant chitinase was submitted to SDS-PAGE, and the corresponding band was excised from the gel and used to immunize rabbits. Antiserum against CHI2 was produced in New Zealand white rabbits, and reactivity to CHI2 chitinase was tested using standard procedures.

#### Northern blot analysis

The wt and constructs of *M. anisopliae* were cultured in media with 1% crystalline chitin or 1% glucose as the sole carbon sources for 96 h at 28°C and 150 rpm. The mycelia were filtered, and total RNA was extracted as previously described (Dutra et al. 2004). Total RNA samples were electrophoretically separated, and sample normalization was carried out using the Qubit system (Invitrogen). Northern blot analysis was carried out using standard procedures (Sambrook and Russel 2001) using radiolabeled *chi*2 (same as used in the Southern analyses; Fig. 1b) and *tub* (comprising nt 347–864 (517 bp) of the  $\alpha$ -*tubulin* ORF—accession number DQ393576.1) probes. After hybridization, the Kodak-K Screen (Kodak) was exposed to the membranes, and digital images of the hybridization signals were obtained using the Pharos system (Bio-Rad).



## Western blot analysis

The wt and constructs from *M. anisopliae* were grown in media containing 1% crystalline chitin or 1% glucose as the sole carbon sources in a bench incubator for 96 h at 28°C and 150 rpm. The mycelia mat was filtered, and the supernatant was lyophilized. The pellets were suspended in one-tenth of the original volume, and approximately 300 µg of each sample was subjected to SDS-PAGE. The proteins were electroblotted onto PVDF membranes for 16 h at 100 V. The membranes were then blocked in blocking buffer for 2 h at room temperature, incubated with primary antibodies (1:1,000) in PBS/0.1% Tween-20 for 1 h at room temperature and washed three times for 10 min each with PBS/0.1% Tween-20. The membranes were subsequently incubated in the presence of secondary antibodies (anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase—Sigma Chemicals; 1:2,000) for 1 h at room temperature and washed three times in PBS/0.1% Tween-20. The hybridization signal was generated using an ECL Plus kit (GE Healthcare), and a digital image was obtained using the VersaDoc system (Bio-Rad).

## Total chitinase activity assay

A total of 0.25 mL of *M. anisopliae* culture supernatant of liquid media containing 1% crystalline chitin or 1% glucose as the sole carbon source was incubated in 0.5 mL of PBS (pH 7.0) buffer containing 0.5 g of colloidal chitin for 5 h at 37°C. The production of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) monomers was evaluated, and the total chitinase activity present in each assay was determined in triplicate. One nkat unit of chitinase was defined as the enzyme amount necessary to catalyze the release of 1 nmol s<sup>-1</sup> of GlcNAc. A standard curve was generated using different concentrations of GlcNAc (1–500 µM). Statistical analyses of the results, which represent data from three different experiments, were done using Analyses of Variance (ANOVA) and Duncan's test ( $P < 0.001$ ) performed by SPSS 13.0 software.

## Endochitinase specific activity assay

The endochitinase specific activity assay was carried out using the 4-methylumbelliferyl-β-D-N, N', N''-Tetraacetylchitotriose oligomer according to standard procedures (McCreath and Gooday 1992), with some modifications. Using a 96-well fluorimeter plate, 95 µL of McIlvain Buffer (0.1 M citric acid; 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6.0) and 5 µL of 0.8 mM 4-methylumbelliferyl-β-D-N, N', N''-Tetraacetylchitotriose were added and incubated for 5 min at 37°C. Then, 10 µL of *M. anisopliae* culture supernatant in liquid media containing 1% crystalline chitin or 1% glucose as the sole carbon sources was added and incubated for 30 min at

37°C. The reaction was stopped using 100 µL of Stop Buffer (1 M glycine/NaOH; pH 10.6) for 5 min at 37°C. Water was used in the control sample. The reading was performed using a fluorimeter set for 355 and 460 nm as the excitement and emission wavelengths, respectively. One nkat unit of chitinase was defined as the enzyme amount necessary to catalyze the release of 1 nmol s<sup>-1</sup> of 4-MU. A standard curve was generated using different concentrations of 4-MU (0.1–10 µM). Statistical analyses of the results, which data from three independent experiments, were done using analyses of variance (ANOVA) and Duncan's test ( $P < 0.001$ ) performed by SPSS 13.0 software.

## Bioassays

The bioassays were conducted according to Lubeck et al. (2008) with modifications as follows. Ten male adults of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (kindly provided by Dr. Célia Carlini, Centro de Biotecnologia, CBiot/UFRGS) were placed inside plastic containers with a water supply and cottonseeds for feeding (Staniscuaski et al. 2005). A fresh conidia suspension at 10<sup>8</sup> conidia/mL was produced, and each bug was immersed for 10 s in the suspension, except those used for the negative control, which were immersed in sterile distilled water. Each of the three biological replicates had three experimental replicates. Host mortality was recorded everyday for 10 days. The obtained data were analyzed by ANOVA, and groups were clustered by Duncan's test ( $P < 0.001$ ) using SPSS 13.0 software.

## Results

In order to elucidate the role of the *M. anisopliae* CHI2 endochitinase, we generated overexpression and knock out constructs for the *chi2* gene using the previously reported capability of *A. tumefaciens* to transfer T-DNA to *M. anisopliae* (Staats et al. 2007). The overexpression and knock out cassettes are shown in Fig. 1b, f, respectively. Fungal transformations using the pPZP::upchi2::bar plasmid yielded approximately 60 ammonium glufosinate resistant transformants per cellophane disk in five independent experiments. A total of 200 transformants were screened by PCR using primer set PS1 (*chi2*CDNAF—5' GGTAC CAATGCATCATCTACGCGCTC 3'; PANDOWN—5' TCCAGATTCGTCAAGCTGTTTGA 3'), which confirms the correct cassette assembly and insertion into *M. anisopliae* genome, and primer set PS2 (BARF—5' CCATGG CCATGAGCCCAGAACGAC 3'; BARR—5' GGATCCT CAGATCTCGGTGACGGG 3'), which amplifies a portion of the *bar* resistance gene. We detected 152 positive transformants with PS1 and PS2 PCRs, and 3 (T5, T12 and T33) clones were used for further analysis (Fig. 1c, d). Fungal

transformation using the pPZP:: $\Delta$ chi2::bar plasmid was less efficient and yielded an average of 40 transformants per cellophane disk in five independent experiments. Primer set PS3 (chi2CDNAF—5' GGTACCAATGCATCATCTAC GCGCTC 3'; chi2CDNAR—5' GGATCCTCACCGGCAT GACGACCACC 3') was used to screen for positive transformants (Fig. 1g). Two positive transformants ( $\Delta$ 22 and  $\Delta$ 25) were identified out of 150 screened.

In order to analyze genomic integration of the overexpression cassette, DNA from *M. anisopliae* strain E6 and from the selected transformants, based on the PS1 and PS2 PCR experiments, was extracted and digested using *EcoRV*. The blotted DNA was hybridized with a probe comprising 0.5 kb of the coding region of the *chi2* gene. A single hybridization signal of 6.5 kb was detected in strain E6, indicating the presence of a single copy of the *chi2* gene (Fig. 1e). Transformants T5 and T12 showed distinct hybridization bands compared to the wt strain. The wt *chi2* locus was replaced with the overexpression cassette since no 6.5-kb signal was detected. In transformant T33 there were hybridization signals originating from both the wt *chi2* locus and the overexpression cassette, suggesting ectopic integration. Therefore, this transformant was chosen for further experiments. Transformant T33 also displayed the highest chitinase activity. Transformants from the knock out experiment selected by PS3 PCR experiments were grown, and DNA was extracted from mycelia. The DNA was digested with *HindIII*, separated by electrophoresis and blotted. The same probe mentioned above was used. We observed a 4.7-kb hybridization signal in the wt strain E6 (Fig. 1h). Transformants  $\Delta$ 22 and  $\Delta$ 25 did not show the wt *chi2* locus hybridization signal; instead, a 5.9-kb signal was detected, confirming that the wt locus was replaced by the knock out cassette.

Expression analyses were performed to confirm the overexpression and deletion of the *chi2* gene in the constructs generated. Chitinase activity, transcripts and CHI2 protein were assayed in the overexpression and knock out constructs and compared to wt levels. Total chitinase and endochitinase activities from constructs T5, T12, T33,  $\Delta$ 22 and  $\Delta$ 25 were assayed in culture filtrates from both glucose and crystalline chitin liquid media. All overexpression constructs showed chitinase activity that was significantly higher ( $P < 0.001$ ) in both experiments compared to wt. The chitinase and specific endochitinase activities in the knock out constructs were slightly diminished in both media with different carbon sources when compared to the wt strain E6 (Fig. 2a, b).

Transcripts of the *chi2* gene were analyzed by Northern blot for the constructs as shown in Fig. 3a from RNA extracted from cultures in glucose and in the presence of chitin. The overexpressing transformant T33 produced *chi2* transcripts that were not suppressed by glucose. The knock

out construct  $\Delta$ 22 did not produce *chi2* transcripts. These results were further confirmed by Western blot analysis using anti-CHI2 serum. Expression of CHI2 in construct T33 was detected in both culture media. No CHI2 recognition was observed in the  $\Delta$ 22 construct in medium containing 1% glucose as the sole carbon source (Fig. 3, panel 1% Glucose, lane 3). A faint recognition band, however, was observed for construct  $\Delta$ 22 in medium containing 1% chitin as the sole carbon source (Fig. 3, panel 1% Chitin, lane 3). This was probably caused by non-specific recognition of another isoform of chitinase once the chitinase system was activated in such medium, and no *chi2* transcript was observed in the Northern blot assays.

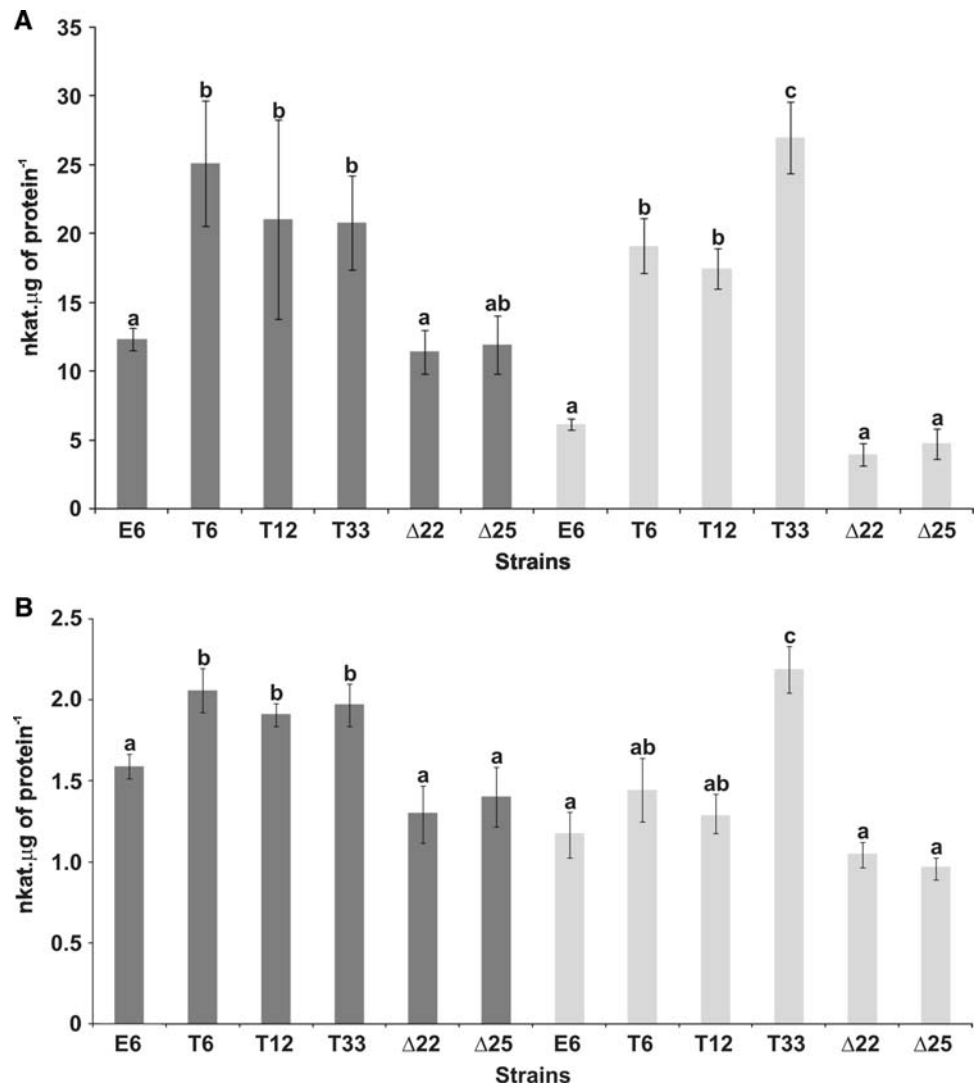
To analyze the participation of CHI2 chitinase in the infection process, both the *chi2* overexpression and knock out constructs were used in bioassays with the cotton stainer bug *D. peruvianus* as a host. A survival curve of the tested constructs is shown in Fig. 4. The LT<sub>50</sub> and LT<sub>90</sub> results demonstrated differences in the ability of the constructs to infect the host (Table 1). The wt strain had an LT<sub>50</sub> of 156 h and an LT<sub>90</sub> of 209 h. In contrast, the CHI2 overexpression construct T33 had an LT<sub>50</sub> of 125 h and an LT<sub>90</sub> of 154 h. This represents a drop of over 20% in the time required to kill the host, suggesting that the CHI2 chitinase enhances virulence. The knock out construct  $\Delta$ 22 had an LT<sub>50</sub> of 186 h and an LT<sub>90</sub> of 267 h, therefore requiring over 20% more time to kill the insect host. These results show that overexpression of CHI2 increased the efficiency of killing *D. peruvianus*, while the *chi2* knock out construct had reduced efficiency compared to wt. The overexpression of the CHI2 chitinase could represent a synergistic effect on the infection process. More significant, however, is the fact that the blocking of a single chitinase gene (CHI2 chitinase) had an important effect in the insect infection efficiency.

## Discussion

*Metarhizium anisopliae* secretes several chitinases, including CHI2, an endochitinase of 42 kDa, which belongs to the subgroup B. Chitinases are thought to be key enzymes during the early stages of the infection process since chitin, associated with proteins, is one of the main compounds of the host cuticles and is highly insoluble. Another important factor is that chitinases are needed during the fungal morphogenesis process once chitin is present in the cell wall and must be remodeled in order to allow hyphae to grow and/or for cell differentiation into appressorium. *Metarhizium* has high chitinase diversity, and at least six chitinases have been observed in glycol-chitin zymogram assays after cultivation in chitin-containing medium (da Silva et al. 2005). In analyzing this complex enzyme family, the elucidation of each chitinase function will allow



**Fig. 2** Total chitinase and endochitinase activity of wild type and constructs. Total chitinase (a) and endochitinase activity (b) were detected in culture supernatants of *M. anisopliae* wild type strain (E6) and constructs overexpressing (T5; T12; T33) or knock out ( $\Delta 22$ ;  $\Delta 25$ ) for the *chi2* gene. Supernatants were obtained from fungi cultivated on medium containing 1% glucose (dark gray bars) or 1% chitin (light gray bars). Bars represent the average of three independent experiments and the lines above bars represent the standard deviation. Bars with the same letter do not differ statistically according to the Duncan's test ( $P < 0.001$ ). One nkat unit of chitinase was defined as the enzyme amount necessary to catalyze the release of  $1 \text{ nmol s}^{-1}$  of GlcNAc for total chitinase activity experiments and  $1 \text{ nmol s}^{-1}$  of 4-MU for specific endochitinase activity experiments



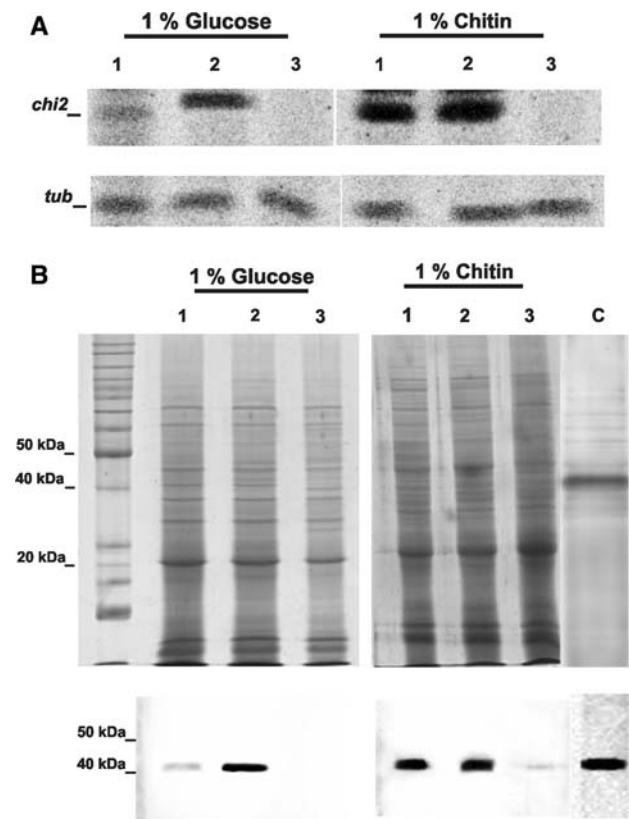
a better understanding of the chitinolytic system. Although little is known about the participation of chitinases in the infection process of entomopathogenic fungi, the endochitinases seem to be responsible for initiating the chitin cuticle solubilization process due to their cleavage characteristics.

Since the *M. anisopliae* chitinase encoded by the *chi2* gene constitutes an endochitinase and is phylogenetically related to other endochitinases previously proven to be important in the infection process of other pathogenic fungi, specifically in mycopathogenic fungi (Seidl et al. 2005), it is probable that the CHI2 chitinase is also important for the *M. anisopliae* host infection process, as shown here. Considering the number of chitinases secreted by *Metarhizium*, it is expected that these enzymes act directly and synergistically along with other hydrolases throughout the infection process in order to solubilize the host cuticle, providing nutrition and allowing fungal penetration, to colonize the entire host. In this study, we demonstrated that

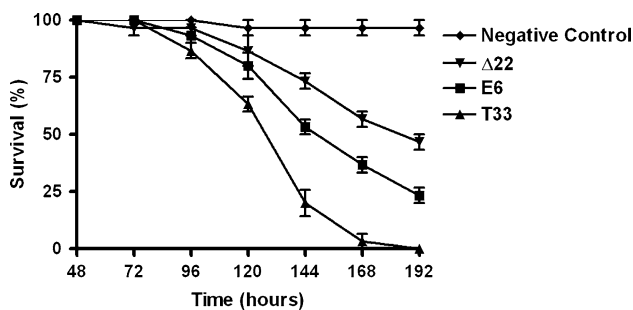
overexpression and deletion of the chitinase encoded by the *chi2* gene alter fungal virulence toward the model host *D. peruvianus*.

Chitinases are a long-term subject of study in filamentous fungi. Genome-wide analyses have suggested that the chitin degradation enzymes are much more complex in these organisms (Seidl et al. 2005). Assigning function for putative chitinases is the actual challenge to understand if most of such diversity is simply redundant or if each chitinase has specific roles in fungal biology. This is particularly important for the entomopathogenic and mycopathogenic fungi that use chitinases during their life cycle and in the course of infection to digest the protective chitin barrier of their hosts.

Subgroups A and B chitinases have been implicated in exogenous chitin degradation, like the subgroup A chitinases *PjChi-1* from *Paecilomyces javanicus* (Chen et al. 2007), the *Crchi1* from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (Gan et al. 2007); and subgroup B chitinases *chi2* and



**Fig. 3** Expression analysis of the *chi2* gene and CHI2 chitinase. **a** Northern blot analysis of *chi2* and *tub* gene expression in wild type and constructs: 1 E6; 2 T33; 3 Δ22. **b** Western blot analysis of CHI2 chitinase expression in wild type and constructs: 1 E6; 2 T33; 3 Δ22



**Fig. 4** Mortality of *Dysdercus peruvianus* in bioassays. Virulence of *M. anisopliae* wild type strain (E6) and constructs overexpressing (T33) or knock out (Δ22) for the *chi2* gene was tested on *D. peruvianus* males. Groups of ten insects were treated with each *M. anisopliae* strain or construct ( $10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) and checked everyday until 100% mortality was achieved. Bars represent the standard error

*chi3* from *M. anisopliae* (Baratto et al. 2006; da Silva et al. 2005). Both subgroups are also involved in cell wall remodeling. *A. nidulans chiA*, a subgroup B chitinase, is a large GPI-anchored chitinase and its deletion decreased germination rates and hyphal growth (Takaya et al. 1998; Yamazaki et al. 2008). Moreover, a subgroup A chitinase

**Table 1** *M. anisopliae*  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  values obtained in bioassays using *D. peruvianus*

Strain/construct	$LT_{50}$ (h) <sup>#</sup>	$LT_{90}$ (h) <sup>#</sup>
E6	156 (150–162) <sup>a</sup>	209 (199–222) <sup>a</sup>
T33	125 (121–129) <sup>b</sup>	154 (149–161) <sup>b</sup>
Δ22	186 (172–208) <sup>c</sup>	267 (238–318) <sup>c</sup>

Values in parentheses represent the confidence interval (95%)

<sup>#</sup> Means followed by the same letter do not differ statistically according to a *t* test ( $P < 0.001$ )

from *A. nidulans*, *chiB*, is implicated in autolysis (Yamazaki et al. 2007). In this study, the deletion of the subgroup B chitinase *chi2* did not show morphological alterations, but diminished *M. anisopliae* virulence. It seems that chitinases from all subgroups are involved in hyphal-related processes and/or infection processes (Seidl 2008).

Some chitinases also have been shown to be important in the infection process of pathogenic fungi. The mycoparasitic fungus *Trichoderma* secretes chitinases (specially subgroup B) in order to break down chitin polymers of host fungi cell walls such as *Rhizoctonia solani* for nutrition, consequently interrupting their development (Seidl et al. 2005). Mutants of the fungus *C. rosea* lacking each of the three different endochitinases displayed altered mycoparasitic activity during interaction with *Fusarium culmorum* in liquid culture. The knock out of the endochitinase genes *cr-ech58* (possibly subgroup A), *cr-ech42* (subgroup A) and *cr-ech37* (subgroup B) each diminished virulence of *C. rosea*. Moreover, disruption of the *cr-ech42* gene showed the stronger effect in reducing the mycoparasitism, indicating that this gene is the most important of the three deleted endochitinases (Mamarabadi et al. 2008).

An acidic mammalian chitinase (subgroup not determined) seems to be important as a defense mechanism against the pathogenic fungi *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* (Chen et al. 2009). In addition, plant endophytic bacterial and viral chitinases are probably involved in defense against pathogenic fungus and insect plagues (Corrado et al. 2008; Quecine et al. 2008; Silvar et al. 2008). The altered virulence of the constructs overexpressing and lacking the *chi2* gene demonstrated that the endochitinase CHI2 (subgroup B) participates in the infection process. This observation is in contrast to previous work in which the non-repressible expression of endochitinase CHIT1 (subgroup A) did not affect *M. anisopliae* virulence toward *M. sexta* (Screen et al. 2001). These authors hypothesized that the basal levels of endochitinase production were sufficient for the early period of infection once the chitin fibers were coated with proteins and somehow occluded, hampering the action of chitinases. As previously demonstrated (Limon et al. 1999; Bowman and Free 2006), however, the overexpression of a chitinase

(subgroup B) in *Trichoderma* spp. enhanced mycoparasitism despite of the protein coat in the host cell wall (Bowman and Free 2006; Latge 2007). It is more likely that a specific chitinase, or group of chitinases, may act differently depending on the host cuticle. Recently, a gene expression analysis comparing strains of *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *acridum*, which are specific or generalist when considering the ability to infect a narrow or a wide range of hosts, showed that CHI2 is present in the generalist strain Ma2575 and not in the specific strain Ma443 (Wang et al. 2009). This suggests that CHI2 participates in the infection processes and that its absence reduces or impairs the fungal capacity to infect certain hosts. As demonstrated by Fan et al. (2007), overexpression of the *Bbchit1* gene (subgroup B) induced high expression of the chitinase encoded by the aforementioned gene and enhanced *B. bassiana* virulence to aphids, diminishing both lethal conidial concentration and lethal time. In addition, genetically modified plants expressing different fungal/bacterial chitinases (subgroup A) have been found to be more resistant to phytopathogen fungi infection and insect feeding (Distefano et al. 2008; He et al. 2008; Kern et al. 2009; Shah et al. 2009).

Based on our findings, we propose that the endochitinase CHI2 (subgroup B) is important for pathogenicity by being secreted and directly acting in the penetration process of the host cuticle. Moreover, neither the overexpressing nor the knock out mutants presented detectable morphological alterations in spores, hyphae and appressorium formation (data not shown). These results strengthen the hypothesis of a specialization of the different chitinases in *Metarhizium*. However, other functions for the same chitinase cannot yet be ruled out at this point. The analysis of mutations in other chitinase genes as well as mutants lacking more than one chitinase should in the future allow a more comprehensive view of the chitin degradation system in *Metarhizium* and other fungi. Understanding fully the nature of chitinase functions could facilitate more effective utilization of *Metarhizium* in pest biocontrol strategies.

**Acknowledgments** This work was supported by CNPq and FAPERGS. JTB and CCS are recipients of CAPES fellowships. AJ and KBA are recipients of CNPq fellowships. Authors acknowledge the time and many suggestions of the two anonymous referees that greatly improved the original manuscript.

## References

- Baratto CM, Silva MV, Santi L, Passaglia LMP, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A (2003) Expression and characterization of the 42 kDa chitinase from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 49:723–726
- Baratto CM, Dutra V, Boldo JT, Leiria LB, Vainstein MH, Schrank A (2006) Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Curr Microbiol* 53:217–221
- Barreto CC, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr Microbiol* 48:102–107
- Bogo MR, Rota CA, Pinto H Jr, Ocampos M, Correa CT, Vainstein MH, 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
- Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28:799–808
- Chen CC, Kumar HG, Kumar S, Tzean SS, Yeh KW (2007) Molecular cloning, characterization, and expression of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*. *Curr Microbiol* 55:8–13
- Chen L, Shen Z, Wu J (2009) Expression, purification and in vitro anti-fungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin Exp Dermatol* 34:55–60
- Corrado G, Arciello S, Fanti P, Fiandra L, Garonna A, Digilio MC, Lorito M, Giordana B, Pennacchio F, Rao R (2008) The Chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco. *Transgenic Res* 17:557–571
- Cove DJ (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 113:51–56
- Covert S, Kapoor P, Lee M, Briley A, Nairn C (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol Res* 105:259–264
- da Silva MV, Santi L, Staats CC, da Costa AM, Colodel EM, Driemier D, Vainstein MH, Schrank A (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol* 156:382–392
- Distefano G, La Malfa S, Vitale A, Lorito M, Deng Z, Gentile A (2008) Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res* 17:873–879
- Duo-Chuan L (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161:345–360
- Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Silveira Schrank I, Henning Vainstein M, 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* 155:245–251
- Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ, Pei Y (2007) Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Appl Environ Microbiol* 73:295–302
- Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G, St Leger RJ (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
- Gan Z, Yang J, Tao N, Yu Z, Zhang KQ (2007) Cloning and expression analysis of a chitinase gene *Crcchi1* from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*). *J Microbiol* 45:422–430
- He X, Miyasaka SC, Fitch MM, Moore PH, Zhu YJ (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) with a rice chitinase gene for improved tolerance to a fungal pathogen *Sclerotium rolfsii*. *Plant Cell Rep* 27:903–909

- Kern MF, Maraschin SD, Vom Endt D, Schrank A, Vainstein MH, Pasquali G (2009) Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. *Appl Biochem Biotechnol* (in press)
- Krieger de Moraes C, Schrank A, Vainstein MH (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr Microbiol* 46:205–210
- Latge JP (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66:279–290
- Limon MC, Pintor-Toro JA, Benitez T (1999) Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89:254–261
- Lubeck I, Arruda W, Souza BK, Stanisçuaski F, Carlini CR, Schrank A, Vainstein MH (2008) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecol* 1:78–88
- Mamarabadi M, Jensen B, Lübeck M (2008) Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. *Curr Genet* 54:57–70
- McCreath KJ, Gooday GW (1992) A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. *J Microbiol Methods* 14:229–237
- Nakazato L, Dutra V, Broetto L, Staats CC, Vainstein MH, Schrank A (2006) Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:521–528
- Pedrini N, Crespo R, Juarez MP (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146:124–137
- Pinto A, Barreto C, Schrank A, Ulhoa C, Vainstein M (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol* 43:322–327
- Qazi SS, Khachatourians GG (2007) Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *J Invertebr Pathol* 95:48–59
- Quecine MC, Araujo WL, Marcon J, Gai CS, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA (2008) Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Lett Appl Microbiol* 47:486–491
- Sambrook J, Russel D (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Screen SE, Hu G, St Leger RJ (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
- Seidl V (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* 22:36–42
- Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP (2005) A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* 272:5923–5939
- Shah JM, Raghupathy V, Veluthambi K (2009) Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Biotechnol Lett* 31:239–244
- Silvar C, Merino F, Diaz J (2008) Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J Plant Physiol* 165:1120–1124
- Staats CC, Junges A, Fitarelli M, Furlaneto MC, Vainstein MH, Schrank A (2007) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:945–950
- Stanisçuaski F, Ferreira-Dasilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR (2005) Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45:753–760
- Takaya N, Yamazaki D, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M (1998) Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:60–65
- Wang C, St Leger RJ (2007) The *Metarhizium anisopliae* perlipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *J Biol Chem* 282:21110–21115
- Wang S, Leclerque A, Pava-Ripoll M, Fang W, St Leger RJ (2009) Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence associated genes in host specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Eukaryot Cell* (in press)
- Yamazaki H, Yamazaki D, Takaya N, Takagi M, Ohta A, Horiuchi H (2007) A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 51:89–98
- Yamazaki H, Tanaka A, Kaneko J, Ohta A, Horiuchi H (2008) *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol* 45:963–972
- Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41:973–981

### ANEXO III

**Artigo: Evidence of alternative splicing of the *chi2* gene of *Metarhizium anisopliae*.** A autoria: Juliano Tomazzoni Boldo, Karina Bohrer do Amaral, Ângela Junges, Paulo Marcos Pinto, Charley Christian Staats, Marilene Henning Vainstein e Augusto Schrank. Artigo submetido ao periódico Fungal Genetics and Biology.

## Evidence of alternative splicing of the *chi2* gene of *Metarhizium anisopliae*

Juliano Tomazzoni Boldo, Karina Bohrer do Amaral, Angela Junges, Paulo Marcos Pinto,  
Charley Christian Staats, Marilene Henning Vainstein and Augusto Schrank

### 1. Introduction

The filamentous fungi *Metarhizium anisopliae* has been used as an interesting alternative to chemical insecticides due to its entomopathogenic characteristics (Lord, 2005). A wide range of insect and acaridae plagues are infected by *M. anisopliae*. The infection of ticks, such as *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Frazzon et al., 2000), and human disease vectors, such as the malaria vector *Anopheles gambiae* (Scholte et al., 2003) and the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Juarez et al., 2000), was reported.

The infection process is well known on its morphological and cellular basis, but the molecular aspects are still far from complete understanding. However, the molecular basis knowledge have significantly increased in the last years (Fang et al., 2009; Fang et al., 2007; Wang et al., 2008; Wang and St Leger, 2007). Several genes and hydrolases are suggested to participate in the process, but only a few were proven to be important (da Silva et al., 2005; Gillespie et al., 1998). Among them, chitinase genes constitute target-genes for function analysis, since the cuticle of the fungus hosts have at least 30% of chitin in its composition (Duo-Chuan, 2006). Also, chitinases participate along the fungus development, breaking chitin fibers in order to allow growth and morphological changes (Latgé, 2007). It was demonstrated *M. anisopliae* has at least six chitinases, but only three chitinase genes were isolated. The *chit1* gene codes a 42-KDa endochitinase (Bogo et al., 1998), the *chi2* gene also codes for a 42-KDa endochitinase (Baratto et al., 2006) and the *chi3* gene codes for a 30-kDa exo/endo-acting

chitinase (da Silva et al., 2005; Pinto et al., 1997). Chitinases are induced *in vitro* by growing *M. anisopliae* in chitin- and host cuticle-containing media and repressed in glucose-containing media (Barreto et al., 2004).

The endochitinase CHI2 gene (*chi2*) was previously isolated and characterized (Baratto et al., 2006). The above cited gene presented two transcript forms in RT-PCR experiments. This result indicates that this gene could suffer differences in its mRNA processing. Other filamentous fungi showed similar differences in a number of gene classes. The lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* presents splicing variations in lignin peroxidase (LiP) genes, as well as (Macarena et al., 2005), the *hex-1* gene from *Neurospora crassa* (Leal et al., 2009) and chitinase genes of *Trichoderma reesei* (Seidl et al., 2005), *Fusarium oxysporum* (Gomez-Gomez et al., 2001), *Neurospora crassa* (Froehlich et al., 2005), *Trichoderma harzianum* (Dana and Pintor-Toro, 2005) and *Mucor circinelloides* (Baba et al., 2005; McGuire et al., 2008) also present splicing variations. It is widely known that unusual splicing events are distributed within all kingdoms. A thorough alternative splicing survey was performed across 42 eukaryotes genomes in order to clarify how spliceosomal introns are recognized. In the survey, it was demonstrated that the prevalent splicing event in the fungi kingdom is the intron retention rather than the formation of exon cassettes (McGuire, 2008).

In this work, we show the partial mRNA processing of the chitinase gene *chi2* of the entomopathogenic fungus *M. anisopliae*, the synthesis of two different enzymes from the same gene and discuss the possible role of such processing. To accomplish this purpose, mRNA of cultured *M. anisopliae* under chitinases induction conditions were submitted to RT-PCR, Northern blot, and qPCR analyses. In order to evaluate whether two proteins are synthesized from both transcripts, two-dimensional Western blot and mass spectrometry analyses were performed.

## 2. Material and Methods

### 2.1. RT-PCR and sequencing analyses

Strain E6 of *M. anisopliae* (Microbial Genetics Group Collection; Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiróz, USP, Brazil) was grown in 1% crystalline chitin-containing media for 16, 24, 32, 40, 48, 56, 72 and 96 h. Mycelia was filtered and total RNA was extracted using a previously reported phenol-chloroform extraction method (Dutra et al., 2004). The samples were treated with 1 U.µg total RNA<sup>-1</sup> DNase and cDNA was synthesized. The *chi2* and *tub* genes were amplified using specific primers spanning the 72 base pairs intron. The PCR was performed in a MJ PTC-200 Thermocycler as follows: 95 °C for 5 min; 95 °C for 1 min, 60 °C for 45 sec, 72 °C for 50 sec (26 cycles); 72 °C for 5 min. The primers used spanned the second intron, Chi2For and Chi2Rev (see table 1). The samples were electrophoretically separated in a 1.5% agarose gel, visualized in a standard UV transilluminator and the results were recorded digitally. For transcripts cloning and sequencing, primers chi2cdnaF and chi2cdnaR were used (see table 1). Cloning procedures were performed using standard procedures (Sambrook and Russel, 2001). Sequencing analyses were performed using a MagaBACE 1000 (GE Life Sciences) automated DNA sequencer and the reactions were performed according to the manufacturer's instructions.

### 2.2. Northern blot analysis

*M. anisopliae* was grown in liquid media containing 1% crystalline chitin (w/v), 1% glucose (w/v), 1% GlcNac (N-acetyl-D-glucosamine) and 0,25% GlcNac as sole carbon sources. After 24, 48, 72, 96 and 120 hours of incubation at 20 °C and 150 RPM, mycelia were filtered, collected and grounded to a fine powder with the aid of liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the phenol-chloroform procedure as previously reported (Dutra et al., 2004).



Samples were electrophoretically separated and digitally recorded. The normalization was performed using the Qubit System (Invitrogen) and the pixel density analysis using the ImageJ software v. 1.41o (Abramoff et al., 2004). The samples were separated in a denaturing agarose 1,5 % gel for 3 hours at 100 V. After electrophoresis, samples were electrotransferred to a nylon membrane and baked at 80 °C for 2 hours. The membrane was pre-hybridized for 2 hours in the appropriate buffer (Sambrook and Russel, 2001). Probes for the *chi2* and *tub* were hybridized for 16 hours at 37 °C after P<sup>32</sup> incorporation. The membrane was washed and exposed to the Kodak-K Screen and the digital image was obtained using the Pharos system (Bio-Rad). Absolute intensity analysis was performed using ImageJ software v. 1.41o.

### 2.3. qPCR analysis

Total RNA samples, extracted for the Northern blot hybridizations, were treated with 1 U.µg total RNA<sup>-1</sup> DNase and cDNA was synthesized. The samples, previously normalized, were subjected to qPCR using specific primers to the *chi2*, *tub* (β-tubulin) and *gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) genes (see table 1). Accordingly to the Northern blot results, the *tub* gene was chosen as reference gene. Also, we used the completely processed form of *chi2* as reference to assess the expression difference of the two transcript forms using a specific incompletely processed set of primers (see table 1). The analysis of the results were performed by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Winer et al., 1999) method and the statistical difference between groups were evaluated using the ANOVA (Analysis of Variance) method and Duncan analysis (P<0,001).

### 2.4. Two-dimensional Western blot analysis

*M. anisopliae* was grown in 1% chitin media for 96 h at 28 °C and 150 RPM in a bench incubator. The mycelia was filtered and the supernatant was lyophilized and resuspended in 1/10 of the original volume. Approximately 2 mg of total protein was

precipitated using 30% trichloroacetic acid for 16 h at 4 °C. Samples were centrifuged at 14.000 g for 15 min, washed with absolute acetone 5 times, air dried and resuspended in 30 µL of Milli-Q water. The proteins were separated according to their isoelectric point in 15 cm IPG strips with pH values ranging from 4 to 7 (Bio-Rad) under the following program: active rehydration (50 V) at 20 °C for 16 h; rapid voltage ramp to 500 V for 1 h; slow voltage ramp to 10.000 V sustained until 70.000 V were accumulated. Samples were subjected to SDS-PAGE and electroblotted to PVDF membrane after absolute methanol treatment for 16 h at 100 V. The blotted membranes were incubated in blocking buffer for 2 h at room temperature with agitation. Then, the primary antibodies against the *chi2* gene (1:1.000) were incubated for 1 h at room temperature with agitation. The membrane was washed 3 times with blocking buffer and incubated 1 h at room temperature with the secondary antibodies (anti rabbit IgG conjugated with peroxidase - Sigma Chemicals; 1:2.000). The hybridization signal was generated using the kit ECL Plus (GE Healthcare) and the digital image was obtained using the Pharos system (Bio-Rad).

## 2.5. Trypsin in-gel digestion and mass spectrometry analysis

Protein spots were manually excised from Coomassie stained gels and in-gel digested with trypsin. Gel plugs were treated in three washing steps with 180 µL of 50% acetonitrile and 50 mM ammonium bicarbonate for 15 min, followed by one washing step with 180 µL of acetonitrile. After the washing procedures, gel plugs were dried by vacuum centrifugation and digested for 18–24 h at 37 °C using 12 µL of 10 mg.mL<sup>-1</sup> modified porcine trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega Corporation) diluted to 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. After tryptic digestion, peptides were extracted in two washing steps with 50 µL of 50% acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) for 1 h. Extracted peptides were dried and resuspended in 10 µL of Milli-Q water.

MS/MS analyses were performed in an electrospray ionization (ESI) quadrupole time-of-flight (Q-TOF) Ultima API mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) coupled to a nano-flow capillary liquid chromatography system (UPLC, Waters, Milford, US). A nano-flow ESI source was used with a lockspray source for lockmass measurement during all the chromatographic runs. Data were acquired in data-dependent mode (DDA), and multiple charged peptide ions (+2 and +3) were automatically mass selected and dissociated in MS/MS experiments. Typical LC and ESI conditions were flow of 300 nl/min, nanoflow capillary voltage of 3.5 kV, block temperature of 100°C, and cone voltage of 50 V.

The MS/MS spectra were processed using Proteinlynx v. 2.0 software (Waters, Milford, US) and the generated PKL files were used to perform database searches using the PEAKS Studio software v. 4.5 (Bioinformatics Solutions, Inc.) against the non-redundant NCBI database and database containing the altered CHI2 protein. Search parameters allowed a maximum of one missed cleavage, the carbamidomethylation of cysteine, the possible oxidation of methionine, peptide tolerance of 0.2 Da, and MS/MS tolerance of 0.2 Da. The significance threshold was set at  $p < 0.05$ , and identification required that each protein contained at least one peptide with an expected value  $< 0.05$ .

### 3. Results

Analyses performed using RT-PCR, Northern blot and qRT-PCR showed two forms of transcripts, confirming previous evidences (Fig. 1 and 2). In the RT-PCR and qRT-PCR experiments, two bands were constantly present. According to the agarose gel analyses, the molecular size difference between both bands was 72 bp approximately. This suggests that the second intron, which has 72 base pairs, was retained in one of the transcripts. Experiments of DNA sequencing demonstrated that both transcripts were originated from the *chi2* gene and

that the first intron, encompassing 211 base pairs, was always excised, while splicing of the second intron was not constant (Fig. 3).

In all the evaluated periods of *M. anisopliae* liquid culture, both forms were present, suggesting either post-transcription control or synthesis of two different enzymes. The probable event is the retention of the second intron and the generation of two transcripts (Fig. 4 A). *In silico* analysis did not show differences in the intron recognition sites of the retained intron and all the consensual sites were present, indicating that the intron retention is not a splice error (Fig. 4 B). Moreover, the last codon of the second intron constitutes a stop codon. The predicted amino acid sequence of the intron is rich in serine residues and could possibly be linked to the fungal cell wall via a GPI anchor remnant, similarly to the fungal/plant chitinase ChiA1, from *Aspergillus fumigatus* (Adams, 2004). However, this feature should be more deeply studied. The last exon, which is not present in the probable encoded protein from the incompletely processed transcript, presents homology to cellulose binding sites, a common feature of family 18 chitinases. Thus, if two proteins are encoded, it is possible that they play different roles in the fungus development.

Northern blot analysis also showed similar results to the RT-PCR experiments (Fig. 1 B, C and D). The *chi2* presented two forms of transcripts, containing 1332 base pairs (incompletely processed transcript) and 1260 base pairs (completely processed transcript). It also demonstrated the *chi2* gene regulation, which is completely repressed in liquid media containing glucose 1% as sole carbon source, highly expressed in media containing crystalline chitin 1% and GlcNac 0.25% as sole carbon sources and moderately expressed in media containing GlcNac 1%. Using another approach, we could observe in a more detailed level the *chi2* gene transcripts regulation and the relative expression between both transcripts. Real-time RT-PCR assays showed the same expression pattern as observed in the Northern blot assays (Fig. 2 A). Gene *chi2* was repressed in glucose-containing media, moderately expressed in GlcNac 1%-containing media and highly expressed in crystalline chitin- and GlcNac 0.25%-

containing media when compared to *tub* gene expression. The completely processed *chi2* gene was also used as reference for relative expression analysis. The incompletely processed form of the *chi2* gene level of expression is higher than the completely processed form in the majority of the analyzed conditions, except for crystalline chitin 1% for 48 and 72 hours of growth, also observed in the Northern blot assays (Fig. 1 B, C and D).

Bidimensional Western blot was used to verify if two proteins were produced from gene *chi2*. Antiserum produced in rabbit, encompassing a common region within both proteins, was blotted against *M. anisopliae* 96 hours crystalline chitin 1% culture supernatant total proteins for specificity analysis. A single band was visualized in a one dimensional SDS-PAGE transferred to a PVDF membrane (data not shown). Since the predicted size of both proteins is too similar (completely processed *chi2* – 43.70 kDa; incompletely processed *chi2* – 43.00), a two dimensional Western blot was performed, once the predict pI from both proteins is distinct and distinguishable by isoelectrofocalization (completely processed *chi2* – 5.26; incompletely processed *chi2* – 6.28). Two spots with the same mass weight, but with different pI values, previously analyzed *in silico* were recognized (Fig. 5 B). This result indicates that two proteins are produced from *chi2* gene.

In order to confirm that the two proteins (from completely and incompletely processed mRNA, CHI2 and CHI2b, respectively) are originated from *chi2* gene due to its regular and alternative splicing patterns, both 2D gel spot referent to the recognition signals observed in the western blot assays were cut from gel, submitted to digestion using trypsin and analyzed by MS/MS. According to *in silico* analyses, both proteins are distinguishable by their C-terminal end. This result confirms that both proteins are originated from *chi2* gene (Table 2).

#### 4. Discussion

In this paper, we report the occurrence of a splice variant of the chitinase encoding gene *chi2*, which contributes to the global expression level of the aforementioned gene. Moreover, not only higher levels of expression of such splice variant is observed in the majority of the conditions tested, it is also responsible for encoding a distinct protein, never reported before. The alternatively spliced transcript could be detected by RT-PCR analysis when the expression pattern of *chi2* was being evaluated. No reverse transcriptase and no DNA template controls were undertaken in order to rule out the possibility of DNA contamination. This fact lead us to investigate such phenomenon, which was never reported in entomopathogenic fungi and may represent an important aspect when analyzing the chitinases function during fungal cell development and infection process, since the coded proteins may play different roles. RT-PCR analyses followed by the cloning and sequencing of the entire *chi2* cDNA demonstrated the retention of the second intron, which contains 72 bp. This observation supports the results are authentic and do not correspond to artifacts generated by the PCR methodology. No point mutations were observed in the splicing acceptor and donor sites in the exon-intron boundary of the sequences analyzed, excluding the possibility of incorrect processing.

Several cases of alternative splicing has been reported in fungi. One of the first reports were published in 1984, where splice variants of the glucoamylase gene of *A. niger* were observed (Boel et al., 1984). Since then, many cases of alternative splicing were observed. As examples, alternative splicing was observed in the *nadp-gdh* gene from *Chlorella sorokiniana* (Miller et al., 1998); *S. cerevisiae* *YKL186C/MTR2* and *YML034W* genes (Davis et al., 2000); *Pneumocystis carinii* *impdh* gene (Ye et al., 2001); *Mucor circinelloides* *rce1* gene (Baba et al., 2005); *Neurospora crassa* *tob55* gene (Hoppins et al., 2007); *N. crassa* *hex-1* gene (Leal et al., 2009). As observed in all the cited articles, the intron retention rather than the formation of

exon cassettes seems to be the prevalent alternative splicing event in fungi, as reported in an article describing a thorough alternative splicing prediction analyses throughout 42 eukaryotic genomes (McGuire et al., 2008). However, this nomenclature is quite controversial, at least considering fungi. In a study of the multicopper oxidase genes (*mco*), from *Phanerochaete chrysosporium*, many splice variants were observed. A comprehensive analyses of the transcripts revealed in frame stop codons within the retained introns, which could impair the translation of functional proteins, generating truncated ones. To this event, the term “altered” splicing was used, to distinguish from the “alternative” splicing, which leads to functional proteins (Larrondo et al., 2004). This nomenclature for describing splicing events was also used for the *lip* genes from *P. chrysosporium* (Macarena et al., 2005). For this study, we used the term “alternative” splicing because although an in frame stop codon was present within the intron sequence, two full proteins were observed in mass spectrometry analyses.

Splice variants were detected in all tested conditions, as observed in the Northern blot analysis, except for glucose 1 %, condition in which *chi2* expression is repressed. The Northern blot results corroborated RT-PCR analyses. Also, Northern blot analyses demonstrate both transcripts expression levels. Apparently, the alternative splicing event is not controlled by the carbon source offered in the liquid medium. Furthermore, the incompletely spliced transcripts expression levels are higher than those from the completely processed form, except for crystalline chitin 1 % after 48 and 72 hours growth time. These results were validated by qRT-PCR using two reference genes, *tub* and completely processed *chi2*. Using *tub* gene as reference, the *chi2* general expression pattern was similar to the Northern blot analyses. Also confirming Northern blot results, the relative expression of the incompletely processed form was higher when *chi2* completely processed was used as reference gene.

In silico analyses predicting splice sites using a database generated from a splicing survey in four *Aspergillus* genomes (Wang, 2009), genus which is closely related to *Metarhizium* genus, revealed conserved acceptor and donor splice sites in the intron-exon

boundaries of the 72 bp intron. This analysis also identified the intron sequences within *chi2* ORF. Therefore, the impaired recognition of the 72 bp intron is not responsible for the intron skipping. Considering the predicted amino acid sequence from both transcripts, we performed a search in PROSITE, InterPro and Pfam databases for protein domains (Finn et al., 2008; Hunter et al., 2009; Sigrist et al., 2002). The protein coded by the completely processed *chi2* presents a catalytic domain characteristic of glycosyl hydrolases family 18 containing a chitin binding domain and a fungal cellulose binding domain at the N-terminus, which is coded by the last exon. This region is absent in the protein coded by the altered transcript. Instead, the predicted amino acid sequence coded by the retained intron possesses a serine rich region and may be anchored to the cell wall by GPI anchor remnant, as suggested for *A. fumigatus ChiA1* gene (Adams, 2004). Usually, fungal/plant chitinases are involved in cell wall remodeling. Thus, cell wall linked chitinase may play a role in morphogenesis and growth (Seidl, 2008). Herein, this difference in the N-terminus denotes different functions for the enzymes coded by the two transcripts species. The enzyme synthesized from the completely processed *chi2* mRNA could be secreted in order to degrade exogenous chitin for nutrition, and the enzyme synthesized from the incompletely processed *chi2* mRNA could be linked to the cell wall and play a role in fungal cell wall development, by breaking endogenous chitin fibers of the cell wall and softening it, allowing the fungus to grow.

In order to verify the synthesis of two proteins, we performed 2D Western blot analyses. Proteins from the supernatant of cultured *Metarhizium* in chitinase inducing medium were subjected to 2D SDS-PAGE. The supernatant proteins were analyzed since the chitinase coded by the *chi2* gene possesses a signal peptide portion on its N-terminus. The blotted proteins were incubated with anti-serum produced in rabbits against a common portion of the two proteins. Two spots, referent to the western blot recognition, were detected closely the theoretical mass weight, although the pI values were different. The spots were subjected to mass spectrometry. Using such method allowed us to detect both proteins and differentiate



them by their C-terminus. Therefore, we concluded that two proteins are synthesized by both transcripts. Although the protein encoded by the incompletely processed *chi2* mRNA contains a putative GPI anchoring, and therefore linked to the cell wall, it is possible that its presence in the supernatant is due the autolysis of the fungal cells after a long period of time in liquid culture caused by nutrient privation (Emri et al., 2008; Yamazaki et al., 2007).

In this work we show the synthesis of two *chi2* gene transcripts species, named *chi2*(1) and *chi2*(2), generated by alternative splicing. Moreover, we show that both transcripts lead to the synthesis of two distinct proteins with possible different biological activities. Mutant strains carrying mutations that modulate the expression profile of both transcripts will improve the knowledge of the splicing process in filamentous fungi.

## References

- Abramoff, M. D., et al., 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophot Int.* 11, 36-42.
- Adams, D. J., 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology.* 150, 2029-35.
- Baba, Y., et al., 2005. Alternative splicing produces two endoglucanases with one or two carbohydrate-binding modules in *Mucor circinelloides*. *J Bacteriol.* 187, 3045-51.
- Baratto, C. M., et al., 2006. Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Curr Microbiol.* 53, 217-21.
- Barreto, C. C., et al., 2004. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr Microbiol.* 48, 102-7.
- Boel, E., et al., 1984. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.* 3, 1097-102.
- Bogo, M. R., et al., 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol.* 37, 221-5.
- da Silva, M. V., et al., 2005. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol.* 156, 382-92.
- Dana, M. M., Pintor-Toro, J. A., 2005. Post-transcriptional control of a glucoamylase gene from *Trichoderma harzianum* under stress conditions. *Mol Microbiol.* 57(1), 250-260.
- Davis, C. A., et al., 2000. Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic Acids Res.* 28, 1700-6.
- Duo-Chuan, L., 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia.* 161, 345-60.
- Dutra, V., et al., 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, 245-51.
- Emri, T., et al., 2008. Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 151, 211-20.
- Fang, W., et al., 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol.* 46, 277-85.
- Fang, W., et al., 2007. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology.* 153, 1017-25.
- Finn, R. D., et al., 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36, D281-8.
- Frazzon, A. P., et al., 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* 94, 117-25.
- Froehlich, A. C., et al., 2005. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 4, 2140-52.
- Gillespie, J. P., et al., 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *metarhizium* spp. for the desert locust, *schistocerca gregaria*. *J Invertebr Pathol.* 71, 128-37.
- Gomez-Gomez, E., et al., 2001. Molecular characterization of a novel endo-beta-1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet.* 40, 268-75.

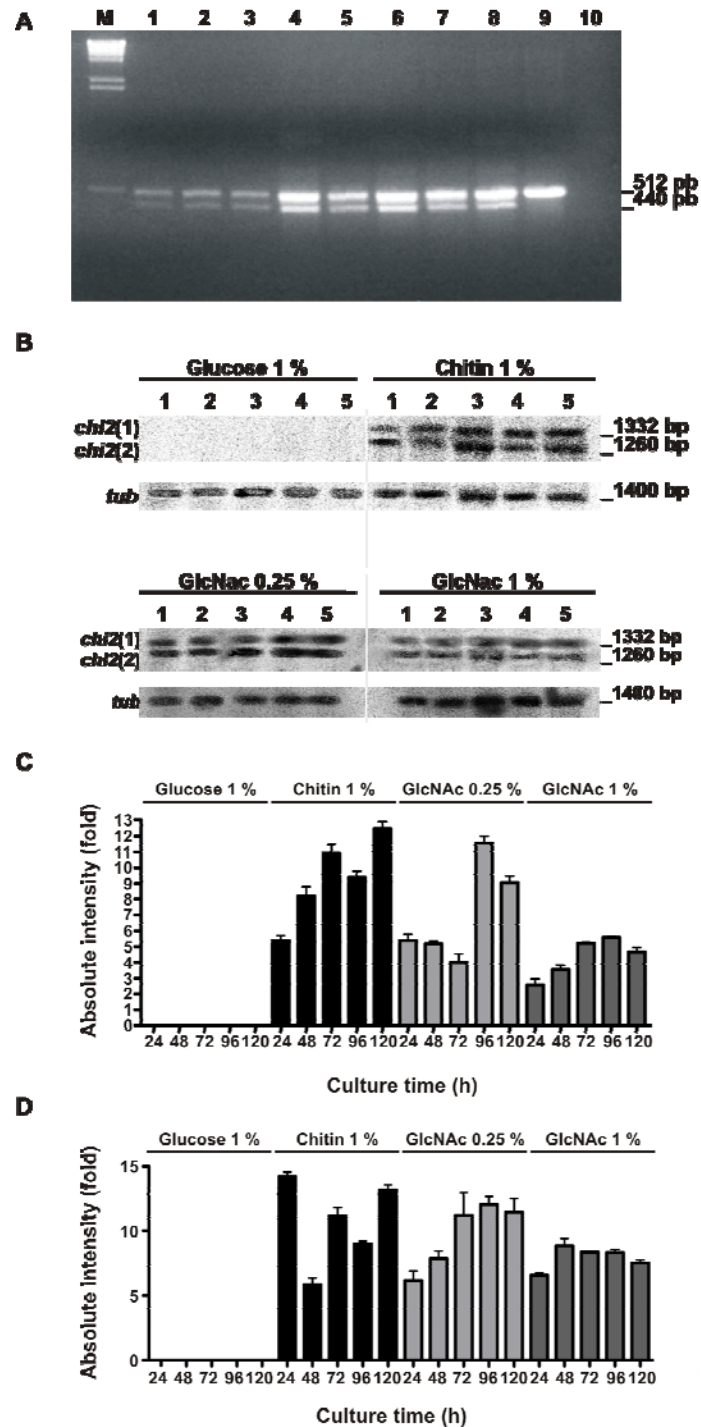
- Hoppins, S. C., et al., 2007. Alternative splicing gives rise to different isoforms of the *Neurospora crassa* Tob55 protein that vary in their ability to insert beta-barrel proteins into the outer mitochondrial membrane. *Genetics*. 177, 137-49.
- Hunter, S., et al., 2009. InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res.* 37, D211-5.
- Juarez, M. P., et al., 2000. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *J Invertebr Pathol.* 76, 198-207.
- Larrondo, L. F., et al., 2004. Characterization of a multicopper oxidase gene cluster in *Phanerochaete chrysosporium* and evidence of altered splicing of the mco transcripts. *Microbiology.* 150, 2775-83.
- Latgé, J. P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol.* 66, 279-90.
- Leal, J., et al., 2009. A splice variant of the *Neurospora crassa* hex-1 transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. *FEBS Lett.* 583, 180-4.
- Lord, J. C., 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol.* 89, 19-29.
- Macarena, S., et al., 2005. Incomplete processing of peroxidase transcripts in the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Lett.* 242, 37-44.
- McGuire, A. M., et al., 2008. Cross-kingdom patterns of alternative splicing and splice recognition. *Genome Biol.* 9, R50.
- Miller, P. W., et al., 1998. Alternative splicing of a precursor-mRNA encoded by the *Chlorella sorokiniana* NADP-specific glutamate dehydrogenase gene yields mRNAs for precursor proteins of isozyme subunits with different ammonium affinities. *Plant Mol Biol.* 37, 243-63.
- Pinto, A., et al., 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology.* 43, 322-327.
- Sambrook, J., Russel, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Scholte, E. J., et al., 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J.* 2, 29.
- Seidl, V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev.* 22, 36-42.
- Seidl, V., et al., 2005. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J.* 272, 5923-39.
- Sigrist, C. J., et al., 2002. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.* 3, 265-74.
- Wang, C., et al., 2008. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell.* 7, 302-9.
- Wang, C., St Leger, R. J., 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell.* 6, 808-16.
- Winer, J., et al., 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 270, 41-9.
- Yamazaki, H., et al., 2007. A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 51, 89-98.
- Ye, D., et al., 2001. Differential splicing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase pre-mRNA. *Gene.* 263, 151-8.

**Table 1. List of primer sets used in this work.**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>Purpose</b>
<b>chi2cdnaF</b>	GGTACCAATGCATCATCTACGCGCTC	<i>chi2</i> gene full length cDNA amplification
<b>chi2cdnaR</b>	GGATCCTCACCGGCATGACGACCACC	<i>chi2</i> gene full length cDNA amplification
<b>chit2For</b>	GCCCCCTTCAACTACAACAA	RT-PCR
<b>chit2Rev</b>	ACACATTGGTAAGGGGGAAC	RT-PCR
<b>chi2F</b>	TTTGAAATGGCGGCAAC	qRT-PCR
<b>chi2R</b>	GGACTGGCAGGTGTGTATGG	qRT-PCR
<b>tubF</b>	CATCTCTGGTGAACACGGC	qRT-PCR
<b>tubR</b>	AGTTGTCGGGACGGAAAAG	qRT-PCR
<b>qPCR_chi2_exon2_NP_F</b>	GCCTCCGAGTTCTACGCC	qRT-PCR
<b>qPCR_chi2_exon2_NP_R</b>	CGAGATTCTTTTTTTTTT	qRT-PCR

**Table 2. MS/MS protein identification evidentiates the synthesis of two different proteins from *chi2* gene.**

Spot ID	Protein Name	Accession Number	Theoretical pI/MW (kDa)	Observed pI/MW (kDa)	PEAKS Score (%)	Sequence Coverage (%)	Matched Peptides (most representatives)
1	CHI2	CAC07216	5.26/43.7	4.63/44.1	100	17	PLTDK ALGINGNAPFNYYNNWTSFIADTPSAGAK IFIGVPASPLASTGTPSGAQYYAAPEQLAAIVGEYR QGDWWSSCR
2	CHI2b	-	6.28/43.0	5.32/43.6	100	67	LTDKISV ALGINGNAPFNYYNNWTSFIADTPSAGAKIFI ISVKPR GQVILSMCSLKKKR



**Fig. 1. The *chi2* gene presents two forms of transcripts. A.** RT-PCR evidentiates two transcripts. (1) 16 h; (2) 24 h; (3) 32 h; (4) 40 h; (5) 48 h; (6) 56 h; (7) 72 h; (8) 96 h; (9) positive control (DNA from E6); (10) no DNA template control. **B.** Northern blot analysis. (1) 24 h; (2) 48 h; (3) 72 h; (4) 96 h; (5) 120 h. *chi2(1)* - *chi2* gene mRNA retaining the 72 bp intron; *chi2(2)* - *chi2* gene mRNA fully processed; *tub* -  $\beta$ -*tubulin* gene (total RNA loading control). **C and D.** expression profile of *chi2(1)* and *chi2(2)*, respectively. Bars represent the relative expression fold average according to Northern blot optic densitometry analysis of two independent experiments ( $\pm$ S.D.).

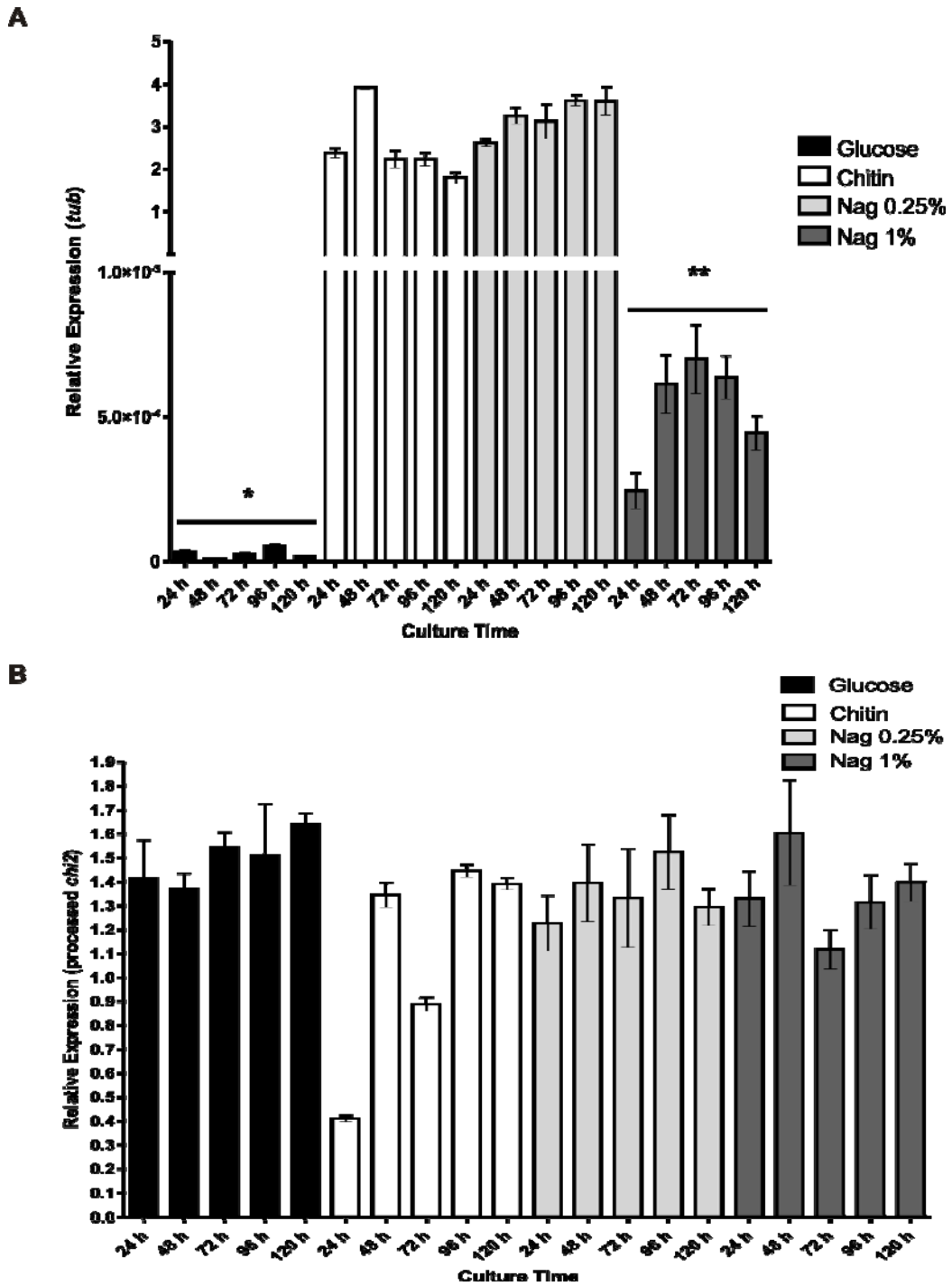
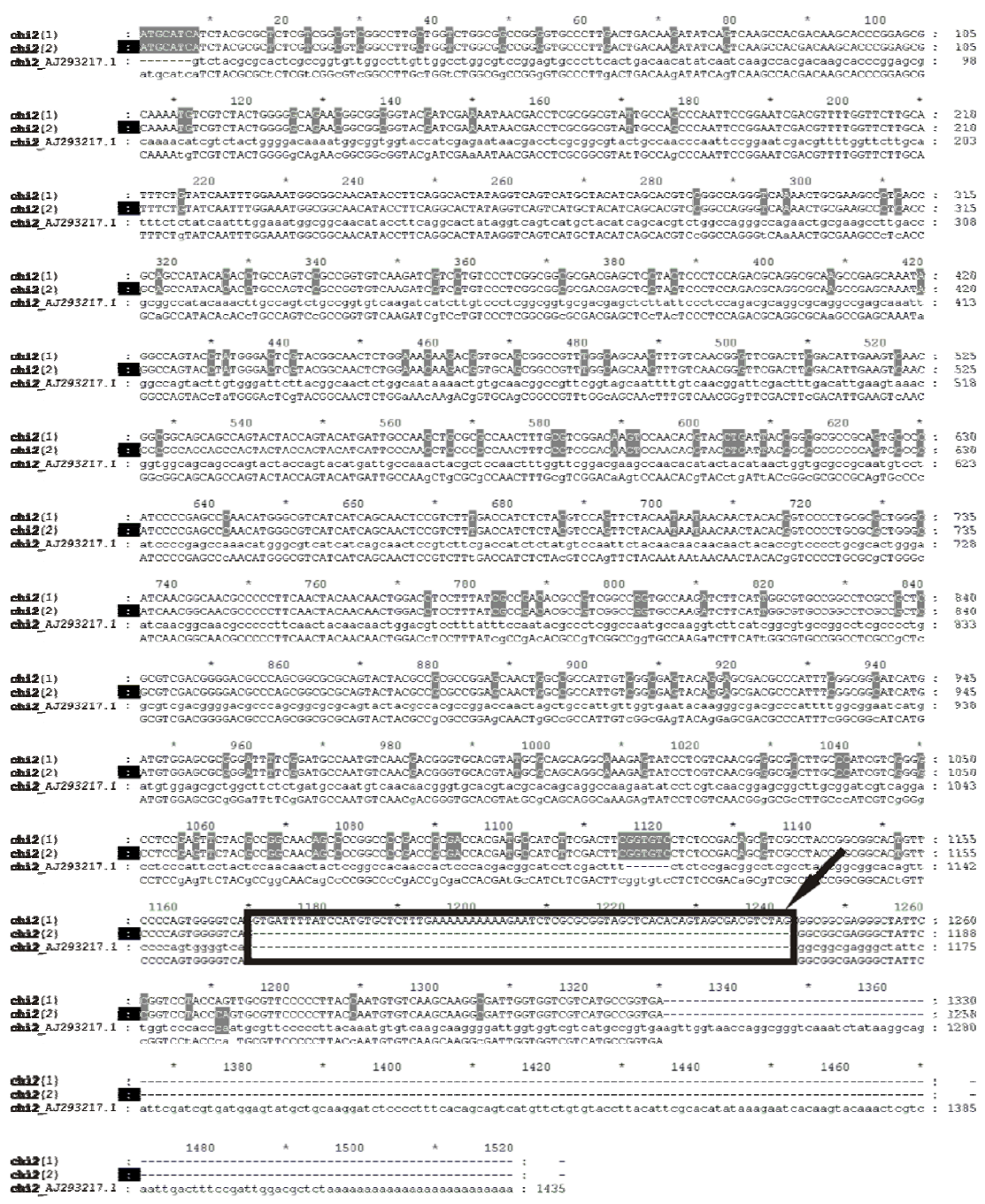
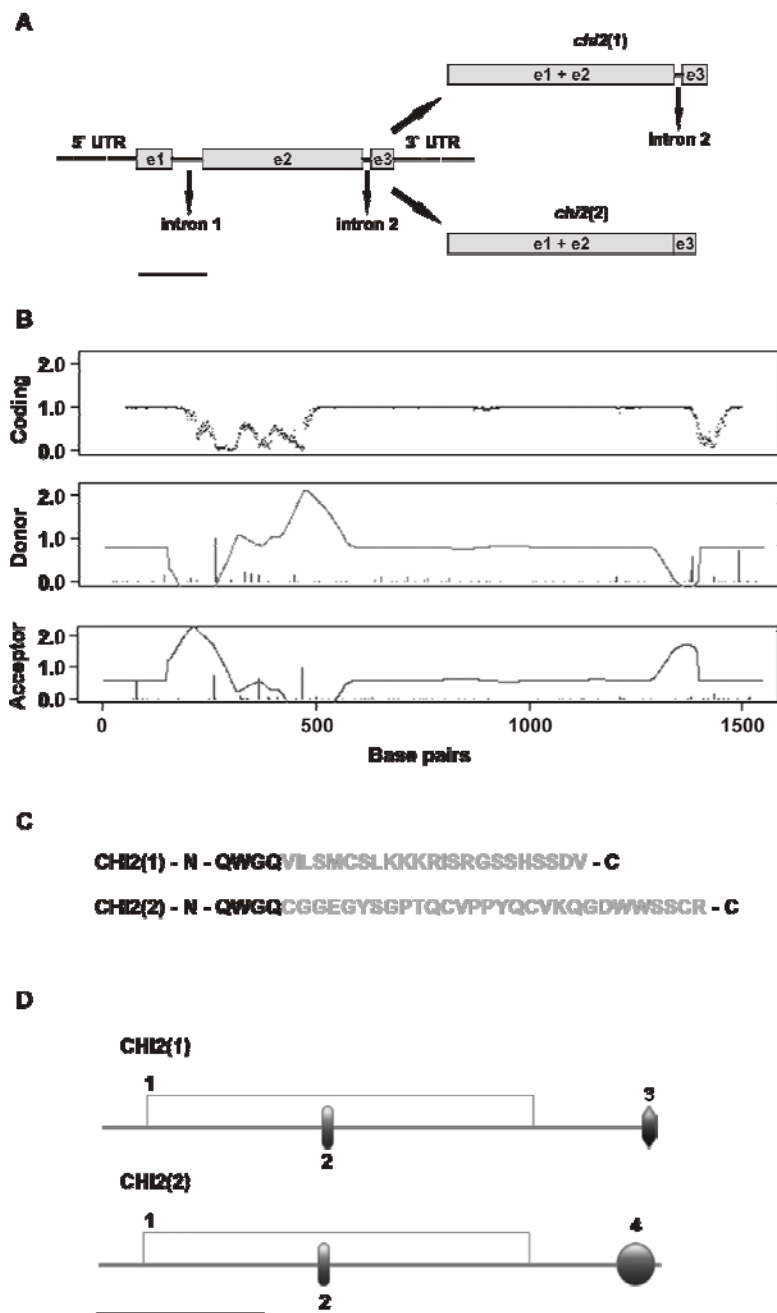


Fig. 2. qRT-PCR of the *chi2* gene. A. *chi2*(1) + *chi2*(2) transcripts expression profile relative to *tub* gene. B. *chi2*(2) transcript expression profile relative to *chi2*(1) transcript.

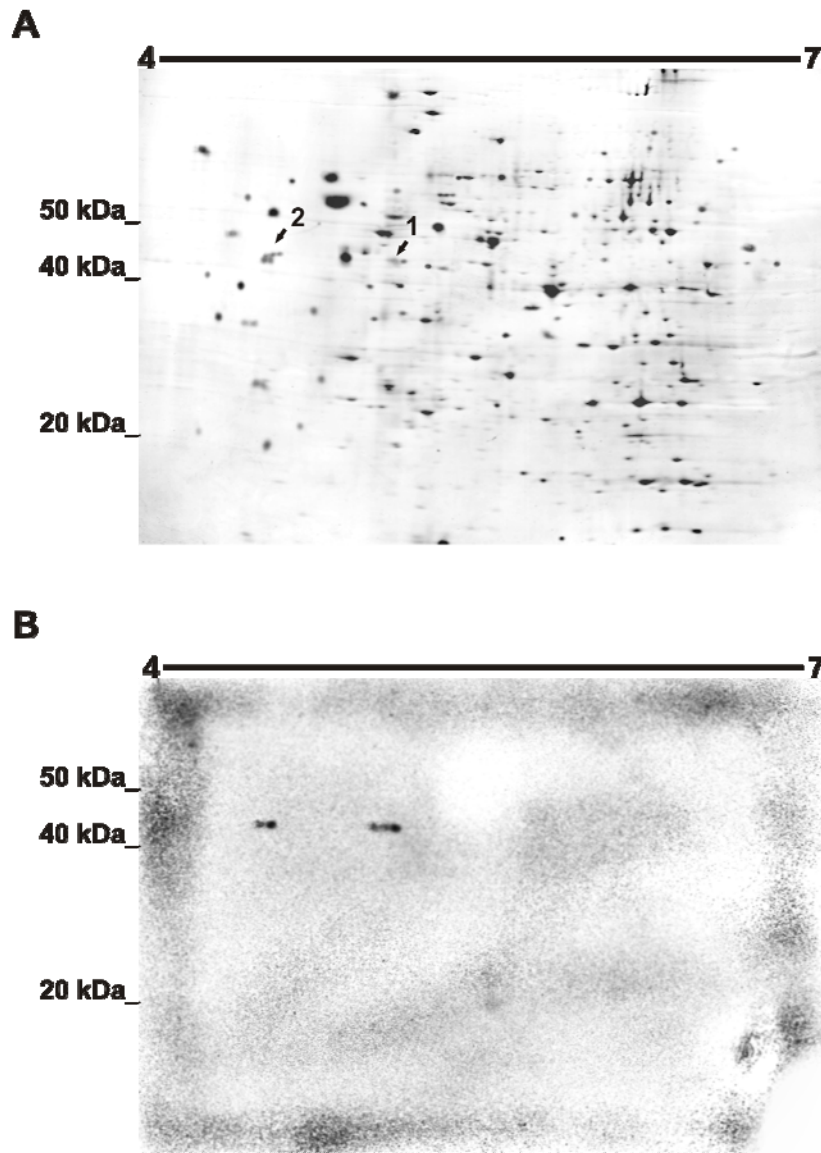


**Fig. 3. Sequencing analysis of both *chi2* gene transcripts. A.** Alignment of *chi2*(1), *chi2*(2) and *chi2* from *M. anisopliae* var. *acridum* (AJ293217.1). Arrow shows in phase stop codon within intron sequence.





**Fig. 4. Predicted synthesis of two proteins from *chi2* gene and bioinformatics analyses. A.** Schematics of the synthesis of two transcripts of the *chi2* gene. Bar represents 500 bp. **B.** Splicing sites prediction (Wang et al, 2009). Coding panel – values close to 0.0 indicate intron region, while values close to 1.0 indicates exon; Donor panel – impulses and curve close to 2.0 indicate strong donor site; Acceptor panel – impulses and curve close to 2.0 indicate strong acceptor site. **C.** C-terminal end differences between both proteins generated from the transcripts. **D.** Domain analyses of the two proteins generated from *chi2* gene. 1 – Glycosyl hydrolases family 18 catalytic domain (E-value:  $1.1e^{-17}$  for both proteins); 2 – Chitin binding domain (E-value:  $1.5e^{-16}$  for both proteins); 3 – Probable GPI anchoring serine rich domain (E-value:  $1.8e^{-2}$ ); 4 - Fungal cellulose binding domain (E-value:  $2.7e^{-12}$ ). Bar represents 100 aminoacids residues.



**Fig. 5. Two proteins are synthesized by the *chi2* gene. A.** 2D SDS-PAGE of proteins obtained from *M. anisopliae* culture supernatant after 96 h at 28 °C and 150 RPM. (1) Spot relative to the CHI2(1) chitinase; (2) Spot relative to the CHI2(2) chitinase. **B.** 2D Western blot analysis.

## **ANEXO IV**

### **Currículo Lattes (até agosto de 2009)**

**Juliano Tomazzoni Boldo**  
Curriculum Vitae

Agosto/2009

# Juliano Tomazzoni Boldo

Curriculum Vitae

---

## Dados Pessoais

**Nome** Juliano Tomazzoni Boldo  
**Filiação** Clovis Domingo Boldo e Marivete Tomazzoni Boldo  
**Nascimento** 04/09/1981 - Canela/RS - Brasil  
**Carteira de Identidade** 4055465613 SSP - RS - 08/01/1996  
**CPF** 97519324087

**Endereço residencial** Rua Intendente Alfredo Azevedo, 1305  
Glória - Porto Alegre  
91710-010, RS - Brasil  
Telefone: 51 93592944

**Endereço profissional** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia,  
Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos  
Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, laboratório 217  
Agronomia - Porto Alegre  
91501-970, RS - Brasil  
Telefone: 51 33086079

## Endereço eletrônico

e-mail para contato : jtboldo@cbiot.ufrgs.br  
e-mail alternativo : horadrins@hotmail.com

---

## Formação Acadêmica/Titulação

- 2004** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Análise Funcional da Quitinase codificada pelo gene *chi2* de *Metarhizium anisopliae*  
Orientador: Augusto Schrank  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1999 - 2003** Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil  
Orientador: Neiva Monteiro de Barros  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 

## Formação complementar

- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Clonagem e Expressão em Sistema Gateway.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Treinamento de Operação do Sistema Äkta Purifier10.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 

## Áreas de atuação

1. Controle do Carrapato Bovino
2. Biologia Molecular de Fungos Filamentosos

---

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
<b>Espanhol</b>	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem
<b>Italiano</b>	Compreende Razoavelmente , Lê Pouco

## Produção em C, T& A

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. Boldo, Juliano Tomazzoni, JUNGES, Angela, Amaral, Karina Bohrer, STAATS, Charley Christian, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto  
Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics*. , p.- - , 2009.
2. Specht, A., AZEVEDO, João Lúcio de, Lima, E. L. A., BOLDO, J. T., Martins, M. K., Lorini, L. M., BARROS, N. M.  
Ocorrência do Fungo Entomopatogênico *Isaria javanica* (Holm ex S.F. Gray) Fr. (Fungi: Hyphomycetes) em Lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae).. *Revista Brasileira de Entomologia*. , v.-, p.- - , 2009.
3. Leal, Ana Lusia, Faganello, Josiane, Fuentefria, Alexandre Meneghello, BOLDO, J. T., Bassanesi, Maria Cristina, Vainstein, Marilene H.  
Epidemiological Profile of Cryptococcal Meningitis Patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. , v.166, p.71 - 75, 2008.
4. STAATS, Charley Christian, BOLDO, J. T., Broetto, L., VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto  
Comparative Genome Analysis os Proteases, Oligopeptide Uptake and Secretion Systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology*. , v.30, p.225 - 229, 2007.
5. BARATTO, César Milton, DUTRA, Valéria, BOLDO, J. T., LEIRIA, Leonardo Barbosa, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto  
Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* gene from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current Microbiology*. , v.53, p.217 - , 2006.
6. CAMPOS, Roberta Alvares, ARRUDA, Walquíria, BOLDO, J. T., AZEVEDO, João Lúcio de, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning, BARROS, Neiva Monteiro de  
*Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana* SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*. , v.50, p.1 - 5, 2005.

#### Capítulos de livros publicados

1. BARROS, Neiva Monteiro de, VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo, SCHRANK, Augusto, BOLDO, J. T., Specht, A.  
Fungos para o Controle Biológico In: Fungos - uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia - in

press ed.Caxias do Sul : Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2009

2. ONOFRE, S. B., VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo, ROSSATO, M., BARROS, Neiva Monteiro de, BOLDO, J. T., NUNES, A. R. F., AZEVEDO, João Lúcio de  
Controle Biológico de Pragas na Agropecuária por meio de Fungos Entomopatogênicos In: Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria.1 ed.Caxias do Sul : EDUCS, 2002, v.1, p. 319-331.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. Specht, A., AZEVEDO, João Lúcio de, Lima, E. L. A., BOLDO, J. T., Martins, M. K., Lorini, L. M., BARROS, N. M.

PRESENCIA E INFESTACIÓN DE *Isaria Javanica* (FRIEDER. & BALLY) SAMSON & HYWELL-JONES (FUNGI: SORDARIOMYCETES) EN LARVAS DE *Lonomia obliqua* WALKER (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE: HEMILEUCINAE) In: 2º Simposio Chileno de Control Biológico: Cambio y oportunidades, 2009, Chillán.

**Anais do 2º Simposio Chileno de Control Biológico: Cambio y oportunidades.** , 2009. p.73 - 73

2. BOLDO, J. T., JUNGES, Angela, AMARAL, K. B., STAATS, Charley Christian, CARVALHO, L. R. M., CARLINI, C., VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

A superexpressão e a deleção do gene *chi2* alteram a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* ao inseto *Dysdercus peruvianus* In: X Reunião Anual do PPGBCM

**Resumos da X Reunião Anual do PPGBCM.** , 2008.

3. Broetto, L., BOLDO, J. T., CARVALHO, L. R. M., VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto  
Caracterização da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae*.Caracterização da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae* In: X Reunião Anual do PPGBCM

**Resumos da X Reunião Anual do PPGBCM.** , 2008.

4. CARVALHO, L. R. M., STAATS, Charley Christian, JUNGES, Angela, BOLDO, J. T., KUNZLER, B., SCHRANK, Augusto

Caracterização do gene ortólogo à *emp1* em *Metarhizium anisopliae* In: X Reunião Anual do PPGBCM

**Resumos da X Reunião Anual do PPGBCM.** , 2008.

5. AMARAL, K. B., BOLDO, J. T., SCHRANK, Augusto

Retenção de íntron no Processamento do Gene *chi2* de *Metarhizium anisopliae* In: XX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, Porto Alegre.

**Resumos do XX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** , 2008. v.1. p.392 - 392

6. BOLDO, J. T., AMARAL, K. B., JUNGES, Angela, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto  
Retenção de íntron no processamento do gene *chi2* de *Metarhizium anisopliae* In: X Reunião Anual do PPGBCM

**Resumos da X Reunião Anual do PPGBCM.** , 2008.

7. Faganello, J., Leal, A. L., BOLDO, J. T., SCHRANK, Augusto, Meyer, W., SCHRANK, I.S., VAINSTEIN, Marilene Henning

Characterization of Polymorphisms in the putative Insulin Degrading Enzyme (IDE) gene from *Cryptococcus neoformans* species complex In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba.

**Revista Argentina de Microbiología.** , 2007. v.39.

8. BOLDO, J. T., JUNGES, Angela, AMARAL, K. B., VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto  
Participação da quitinase *chi2* de *Metarhizium anisopliae* durante a infecção de hospedeiros - deleção e superexpressão In: IX Aniversário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007, Porto Alegre.

**Resumos do IX Aniversário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** , 2007. v.1. p.25 - 25

9. BOLDO, J. T., JUNGES, Angela, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto  
Análise dos Transcritos do Gene *chi2* de *Metarhizium anisopliae* In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre.

**Livro de Resumos do VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.** , 2006. v.1. p.12 - 12

10. Leal, A. L., Faganello, J., Fuentefria, A. M., BOLDO, J. T., Bassanesi, M. C., VAINSTEIN, Marilene Henning

Estudo Epidemiológico do Perfil dos Pacientes com Meningite Criptocócica no Estado do Rio Grande do Sul In: 33º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2006, Curitiba.

**Anais do 33º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** , 2006.

11. JUNGES, Angela, BOLDO, J. T., SCHRANK, I.S., SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Expressão da quitinase codificada pelo gene *chi2* de *Metarhizium anisopliae* em *Escherichia coli* In: XVIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2006, Porto Alegre.

**CD do XVIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS.** , 2006.

12. BOLDO, J. T., JUNGES, Angela, STAATS, Charley Christian, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Construção de uma Linhagem de *Metarhizium anisopliae* superexpressando a quitinase codificada pelo gene *chi2* In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre.

. , 2005.

13. BOLDO, J. T., STAATS, Charley Christian, PALMA, Lenise P, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Caracterização do Gene *chi2* do Fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2004, Porto Alegre.

**Livro de Resumos da VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.** , 2004. v.1. p.14 - 14

14. PALMA, Lenise P, STAATS, Charley Christian, BOLDO, J. T., VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Caracterização do ortólogo do gene *pth11* do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2004, Porto Alegre.

**Livro de Resumos da VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.** , 2004.

15. ONOFRE, Sidney Becker, BOLDO, J. T., VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo, AZEVEDO, João Lúcio de, BARROS, Neiva Monteiro de

Patogenicidade de Híbridos por Fusão Celular entre os Entomopatógenos *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae* no Controle Biológico do Carrapato do Gado *Boophilus microplus* In: V Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2004, Caxias do Sul.

**Resumos do V Simpósio de Ciência e Tecnologia.** , 2004. v.1. p.123 - 123

16. CAMPOS, Roberta Alvares, SILVA, Márcia Vanusa da, LÜBECK, Irina, BOLDO, J. T., BARROS, Neiva Monteiro de, VAINSTEIN, Marilene Henning

Quitinases e B-1,3-glicanases Secretadas pelos Fungos *Beauveria amorpha* e *Beauveria bassiana* Durante o Processo de Infecção do Carrapato *Boophilus microplus* como Determinantes de Patogenicidade In: V Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2004, Caxias do Sul.

**Resumos do V Simpósio de Ciência e Tecnologia.** , 2004. p.124 - 124

17. BARROS, Neiva Monteiro de, CAMPOS, Roberta Alvares, BOLDO, J. T., AZEVEDO, João Lúcio de  
Bioensaios com *Beauveria bassiana* e *Beauveria amorpha* para o Controle Biológico de *Boophilus microplus* In: 8º Siconbiol, 2003, São Pedro/SP.

**Livro de Resumos do 8º Siconbiol.** , 2003. v.1. p.68 - 68



18. BOLDO, J. T., VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo, BARROS, Neiva Monteiro de  
Caracterização Enzimática, Avaliação da Virulência e Patogenicidade de Linhagens do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium* spp. e Compatibilidade com Acaricidas Químicos In: XI Encontro de Jovens Pesquisadores, 2003, Caxias do Sul.

**Resumo dos Trabalhos.** , 2003. v.1. p.156 - 156

19. BARROS, Neiva Monteiro de, CAMPOS, Roberta Alvares, ARRUDA, Washington, BOLDO, J. T., SCHRANK, Augusto

Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos Fungos *Beauveria bassiana* e *Beauveria amorpha* durante o Processo de Infecção no Carrapato *Boophilus microplus* e determinação da Secreção de Subtilisina In: 8º Siconbiol, 2003, São Pedro/SP.

**Livro de Resumos do 8º Siconbiol.** , 2003. v.1. p.68 - 68

20. BOLDO, J. T., ONOFRE, S. B., AZEVEDO, João Lúcio de, VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo, BARROS, Neiva Monteiro de

Atividade Proteásica e Quitinásica do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium* sp e sua Virulência sobre o Carrapato Bovino *Boophilus microplus* In: 6º Encontro de Biólogos da Região Sul, 2002, Porto Alegre.

**Resumos do 6º Encontro de Biólogos da Região Sul.** , 2002. p.20 - 20

21. BOLDO, J. T., ONOFRE, S. B., VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo, DALFOVO, V., CAMPOS, Roberta Alvares, RIES, J., LUZ, J., AZEVEDO, João Lúcio de, BARROS, Neiva Monteiro de

Avaliações Preliminares da Ação do Fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o Carrapato Bovino em Condições de Campo In: 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, 2002, Manaus.

**Resumos do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia.** , 2002. p.247 - 247

22. BOLDO, J. T., BARROS, Neiva Monteiro de

Caracterização Enzimática de *Metarhizium* sp e sua Patogenicidade em *Boophilus microplus* em condições de campo In: X Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2002, Caxias do Sul.

**Resumos do X Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul.** , 2002. p.145 - 145

23. VERDI, M. E. R., PASINATO, G. A., FONTANELLA, A. C., CECCONELLO, D., BOLDO, J. T., PEREIRA, R., TONETT, B., RUSCHEL, D. B., RIZZON, I. L., SILVA, L. R. V., SEHNEM, N. T., RIBEIRO, T. S., DALFOVO, V., BERNARDI, L., SANTOS, L., FRISON, R., GASPARETTO, N., BRINKER, J. M.

Organização e Aplicação de CD-ROM de Temas Específicos na Área de Ciências Biológicas do Ensino Médio e Análise de Aprendizagens In: X Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2002, Caxias do Sul.

**Resumos do X Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul.** , 2002. p.162 - 162

24. CAMPOS, Roberta Alvares, PIMENTEL, I. C., BOLDO, J. T., FEDRIZZI, M., LUZ, J., RIES, J., AZEVEDO, João Lúcio de, BARROS, Neiva Monteiro de

Virulência de uma Linhagem Endofítica de *Beauveria bassiana* sobre o Carrapato Bovino *Boophilus microplus* In: 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, 2002, Manaus.

**Resumos do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia.** , 2002. p.247 - 247

25. NUNES, A. R. F., VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo, BOLDO, J. T., BARROS, N. M.

Utilização do Fungo *Nomuraea rileyi* como Alternativa de Controle Microbiológico da Lagarta da Soja In: V Congresso de Ecologia do Brasil, 2001, Porto Alegre - RS.

**Resumos do V Congresso de Ecologia do Brasil.** , 2001. p.448 - 448

26. BOLDO, J. T., ONOFRE, S. B., AZEVEDO, João Lúcio de, BARROS, Neiva Monteiro de

Virulência de *Metarhizium flavoviride* ao Carrapato Bovino In: IX Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2001, Caxias do Sul.

**Resumos dos Trabalhos do IX Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS.** , 2001. p.108 - 108

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. CARVALHO, L. R. M., PORCIUNCULA, J. O., BOLDO, J. T., Broetto, L., JUNGES, Angela, SILVA, L. K.

R., CRESTANI, J., KUNZLER, B., STAATS, Charley Christian, VAINSTEIN, Marilene Henning, SCHRANK, Augusto

Caracterização do ortólogo do gene emp1 em *Metarhizium anisopliae* In: IX Aniversário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007, Porto Alegre.

**Resumos do IX Aniversário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** , 2007. v.1. p.25 - 25

## **Orientações e Supervisões**

### **Orientações e Supervisões concluídas**

#### **Iniciação científica**

1. Karina Bohrer do Amaral. **Retenção de Íntron no Processamento do Gene chi2 de *Metarhizium anisopliae*.** 2008. Iniciação científica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2. Ângela Junges. **Expressão Heteróloga da Quitinase CHI2 de *Metarhizium anisopliae* em *Escherichia coli*.** 2007. Iniciação científica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul