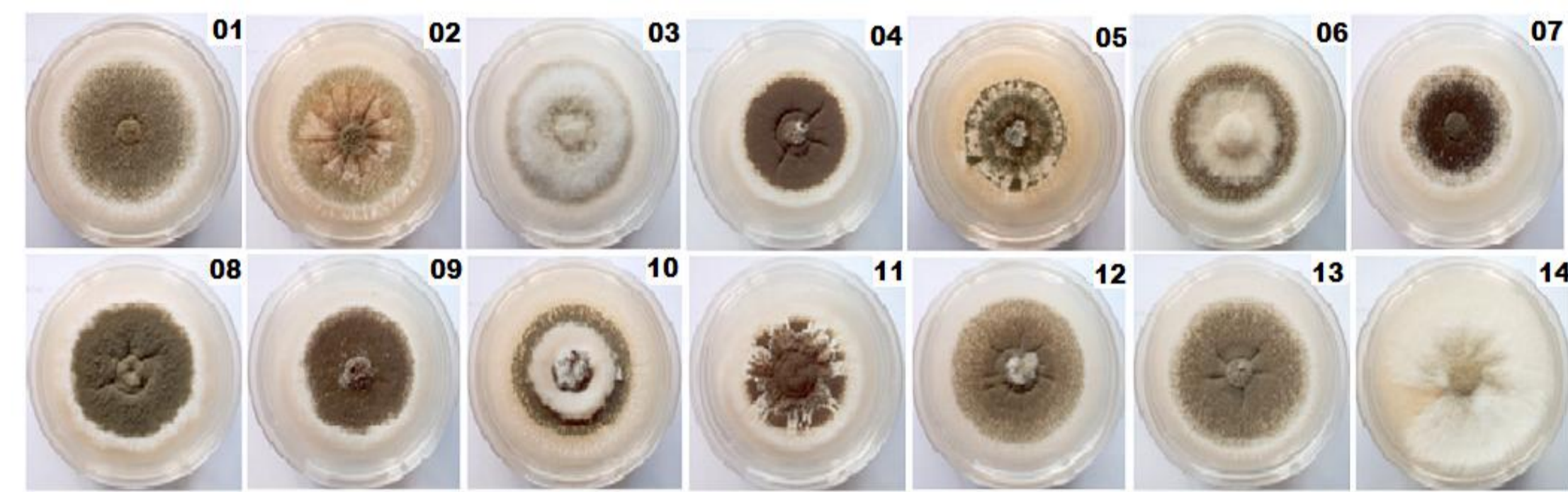


Nicolau Sbaraini Oliveira<sup>1,2</sup>, Ângela Junges<sup>1,2</sup>, Thaiane Rispoli<sup>1,2</sup>, Moara Rodrigues Mingori<sup>1,2</sup> e Augusto Schrank<sup>1,2</sup>

1- PPGBCM (CBIOT/UFRGS). 2- Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (CBIOT/UFRGS).

## 1. Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é modelo para estudos das interações entre patógenos e seus hospedeiros devido a grande eficiência em infectar diferentes artrópodes. Para infectar seus hospedeiros *M. anisopliae* produz enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula, dentre as quais estão as quitinasases. Em fungos essas enzimas apresentam função morfogênica, autolítica e nutricional, atuando em diferentes etapas do desenvolvimento, sendo fundamentais para a sobrevivência do fungo. A quitina é um componente comum à parede celular de fungos e ao exoesqueleto dos hospedeiros artrópodes. Uma análise genômica da linhagem E6 de *M. anisopliae*, realizada em nosso laboratório, identificou vinte e três quitinasases que foram categorizadas em quatro subgrupos, sendo nove pertencentes ao subgrupo A, sete ao B, quatro ao C e três a um novo subgrupo D. Considerando essa variedade de quitinasases identificadas nesta linhagem, o presente estudo visa avaliar a diversidade de quitinasases em outras linhagens de *M. anisopliae* para conhecer a distribuição destes genes nas populações do fungo. As linhagens escolhidas (CG291, NORDESTE, CARO7, CG125, CG343, CG374, CG46, CARO12, CARO14, CARO19, CG30, CG97 e CG320) já foram utilizadas anteriormente em trabalhos no nosso laboratório e em bioensaios com o carrapato-de-boi (*Boophilus microplus*) a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) e o percevejo manchador-de-algodão (*Dysdercus peruvianus*).



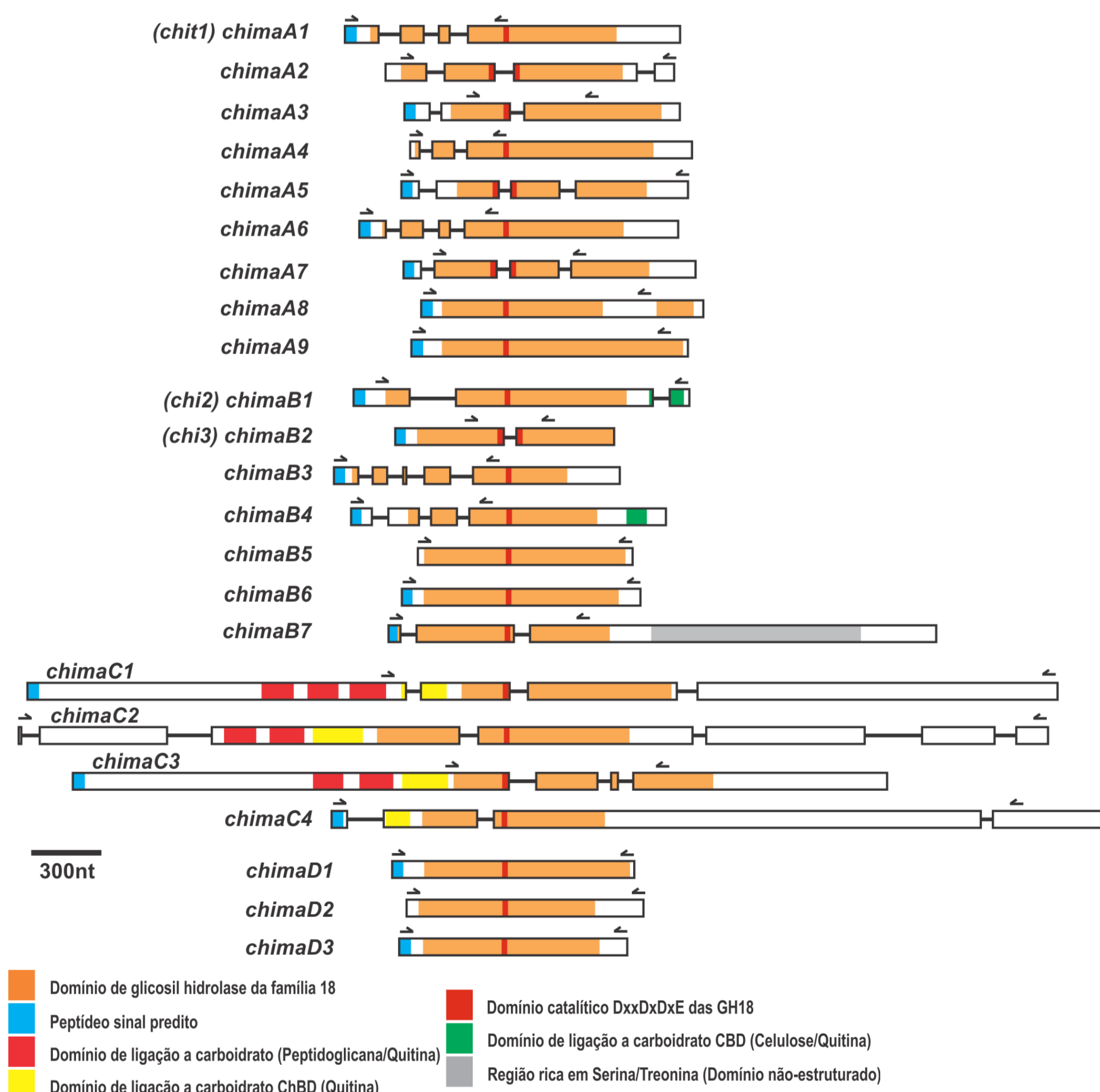
**Fig.1. Linhagens de *M. anisopliae* utilizadas neste trabalho:** 1) E6; 2) CG291; 3) NORDESTE; 4) CARO7; 5) CG125; 6) CG343; 7) CG374; 8) CG46; 9) CARO12; 10) CARO14; 11) CARO19; 12) CG30; 13) CG97; 14) CG320 (Schrank, 2010).

## 2. Materiais e Métodos

**2.1. Suspensão de Esporos:** A suspensão foi feita lavando esporos cultivados em Meio de Cove Completo (MCc) com solução de Tween 0,01%.  $1 \times 10^6$  esporos/mL foram inoculados em 100 mL de MCc líquido e cultivados em plataforma rotatória a 28°C e 180 rpm por 48h.

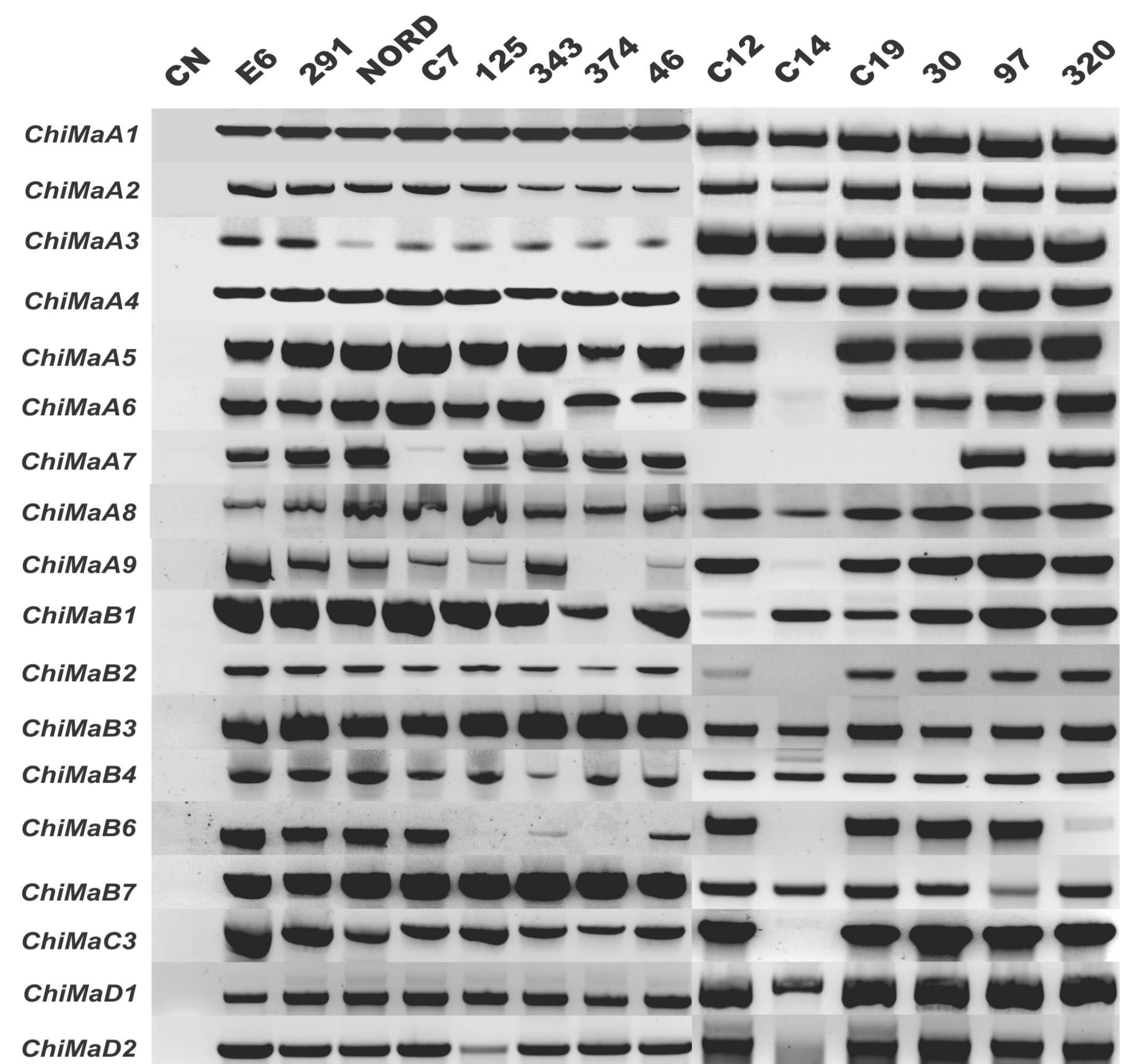
**2.2. Extração de DNA:** Após o cultivo, o DNA foi extraído com Solução de Lise e após, tratado com fenol e clorofórmio. O material foi então tratado com Ribonuclease (RNAse) 2mg/mL.

**2.3. Análise da presença da quitinasases:** A presença das quitinasases foi detectada por PCR, utilizando *primers* desenhados para as quitinasases de *M. anisopliae* da linhagem E6, conforme demonstrado na fig.2. Os produtos finais da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%.



**Fig.2. Estrutura de domínios das 23 quitinasases previstas de *M. anisopliae*.** Domínios protéicos identificados utilizando o banco de dados do NCBI são mostrados (Junges, 2010).

## 3. Resultados e Discussão



**Fig.3. Análise da presença de quitinasases:** A ausência de banda indica possíveis mutantes naturais. (CN)- Controle Negativo; (E6)- Controle Positivo.

Tomando como base as 23 quitinasases identificadas na linhagem E6, após as análises realizadas por PCR foi possível perceber que essas enzimas são bem conservadas em outros isolados.

Os resultados indicam que a linhagem CG374 não apresentou as quitinasases ChiMaA9 e ChiMaB6 presentes na linhagem E6. A linhagem CARO12 não apresenta a quitinase ChiMaA7 assim como as linhagens CARO19, CG30 e CARO14. Essa última linhagem não apresenta quatro quitinasases (ChiMaA5, ChiMaA7, ChiMaB2 e ChiMaB6), o que a torna um interessante objeto de estudo, por ser um possível mutante natural.

A ausência da detecção de quitinasases em algumas das linhagens não implica necessariamente na ausência do ortólogo, pois os *primers* utilizados foram desenhados com base na linhagem E6. O trabalho propõe que essas linhagens sirvam como objeto de estudo para futuros trabalhos.

A ausência de quitinasases em algumas linhagens nos leva a questionar quais seriam as vantagens e as desvantagens dessas enzimas no crescimento, desenvolvimento, morfologia e patogenicidade do fungo.

## 4. Conclusões

As quitinasases identificadas em E6 são conservadas nas outras cepas de *Metarhizium anisopliae* estudadas. No entanto, algumas quitinasases não são detectadas.

Foram identificados possíveis mutantes, os quais serão objetos de estudo para trabalhos futuros visando determinar a função dessas enzimas no metabolismo do fungo.

## 5. Perspectivas

Concluir a análise com o PCR para as quitinasases ChiMaB5, ChiMaC1, ChiMaC2, ChiMaC3 e ChiMaD3.

Confirmar os resultados por hibridização (*Southern Blot*) com os possíveis mutantes naturais para confirmar a ausência dos genes.

Avaliar a presença do padrão de expressão (transcritos) das quitinasases em diferentes condições de cultivo: Micélio cultivado em meio completo (MCc), micélio cultivado em meio contendo N-acetilglicosamina (0,25%), micélio cultivado em meio contendo quitina (1%) e nos esporos.

## 6. Referências Bibliográficas

- JUNGES, A. *Metarhizium anisopliae* : expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinasases. Tese de Mestrado, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267-1274, 2010.
- ARRUDA, W. 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, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- LUBECK, I. Avaliação do potencial inseticida de *Metarhizium anisopliae* contra *Dysdercus peruvianus* e *Anticarsia gemmatilis*. Tese de doutorado, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

## 7. Apoio Financeiro

LNCC, Cbiot, CAPES, CNPq, FAPERGS.