

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

***METARHIZIUM ANISOPLIAE*: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA TÓXICA  
DE ORIGEM VEGETAL E ANÁLISE GENÔMICA DE  
QUITINASES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ÂNGELA JUNGES**

Porto Alegre, 2010

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

***METARHIZIUM ANISOPLIAE*: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA TÓXICA  
DE ORIGEM VEGETAL E ANÁLISE GENÔMICA DE  
QUITINASES**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular da UFRGS como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre

**ÂNGELA JUNGES**

**DR. AUGUSTO SCHRANK, orientador**

**DRA. CÉLIA REGINA CARLINI, co-orientadora**

**DRA. MARILENE HENNING VAINSTEIN, co-orientadora**

Porto Alegre, abril de 2010.

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. O sequenciamento do genoma de *M. anisopliae* foi realizado no Laboratório Nacional de Computação Científica - LNCC. O auxílio financeiro foi obtido da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

**BANCA EXAMINADORA**

**Dra. Maristela Pereira**

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal de Goiás

**Dr. Juliano Tomazzoni Boldo**

Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos  
Centro de Biotecnologia da UFRGS

**Dra. Fernanda Stanisçuaski**

Laboratório de Proteínas Tóxicas  
Centro de Biotecnologia da UFRGS

**Dra. Irene Silveira Schrank**

Membro Suplente da Banca Examinadora  
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia  
Centro de Biotecnologia da UFRGS

## **DEDICATÓRIA**

**AO VITOR E À MINHA FAMÍLIA**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente as pessoas que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, especialmente:

Ao Dr. Augusto Schrank, pelas oportunidades e confiança depositadas na minha capacidade e pelos conhecimentos transmitidos que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra. Marilene Henning Vainstein, por me receber nos laboratórios desde a Iniciação Científica, pelas oportunidades de aprendizado e pela confiança depositada.

À Dra. Célia Regina Ribeiro Carlini, pelo apoio e atenção durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Charley Christian Staats e ao Dr. Juliano Tomazzoni Boldo, que foram meus mestres durante esta trajetória.

À Comissão de Acompanhamento, composta pelos profs. Charley C. Staats e Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, pela supervisão durante a execução do projeto.

Aos integrantes da banca, Dra. Maristela Pereira, Dr. Juliano Tomazzoni Boldo e Dra. Fernanda Stanisçuaski pelas correções e valiosas sugestões.

À Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos, Marisa Fabiana Nicolás, Rangel Celso Souza e Luis Gonzaga Paula de Almeida, integrantes do Laboratório Nacional de Computação Científica.

À Anne Helene Martinelli e ao Laboratório de Proteínas Tóxicas, pela sua ajuda durante a execução do projeto.

Aos meus colegas de laboratório pelo carinho e amizade que tornaram os dias de dedicação em dias muito mais prazerosos e divertidos: Juliano, Lis, Bárbara, Juliana Beringer, Broetto, Juli, Mel, Caru, Lívia, Charley e Virgínia.

As minhas queridas amigas Mel, Juli, Caru e Lis, por todos os momentos felizes.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xi</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<i>1.1. METARHIZIUM ANISOPLIAE: Características Gerais.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2. Biocontrole por Fungos Filamentosos .....</i>	<i>7</i>
<i>1.3. Mecanismo de Infecção e Fatores de Virulência .....</i>	<i>11</i>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3. CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<i>3.1.1. Potencialização do Biocontrole por Entomopatógenos.....</i>	<i>25</i>
<i>3.1.2. Peptídeo Entomotóxico Jaburetox-2Ec.....</i>	<i>28</i>
<b>3.2. OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<i>3.3.1. Material Biológico .....</i>	<i>30</i>
<i>3.3.2. Meios de Cultivo e Manutenção dos Organismos.....</i>	<i>31</i>
<i>3.3.3. Manipulação de Ácidos Nucléicos.....</i>	<i>31</i>
<i>3.3.4. Soluções e Enzimas Utilizadas.....</i>	<i>32</i>
<i>3.3.5. Construção de pPZP::JAB::BAR para Agrotransformação.....</i>	<i>32</i>
<i>3.3.6. Agrotransformação de M. anisopliae e Confirmação da Inserção dos Cassetes</i> .....	<i>33</i>
<i>3.3.7. Análise da Expressão de Jaburetox-2Ec por M. anisopliae .....</i>	<i>34</i>
<i>3.3.8. Isolamento do Promotor e do Peptídeo Sinal contidos no Gene da Trealase</i> <i>Ácida de M. anisopliae .....</i>	<i>34</i>

---

3.3.9. <i>Análise Bioinformática da Trealase Ácida</i> .....	35
3.3.10. <i>Construção de Vetores para Estudos de Regulação pelo Promotor da Trealase Ácida</i> .....	36
<b>3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
3.4.1. <i>Construção do Vetor Expressando a Proteína Entomotóxica Jaburetox-2Ec</i> ...	37
3.4.2. <i>Seleção de Transformantes de M. anisopliae</i> .....	39
3.4.3. <i>Análise da Expressão de Jaburetox-2Ec por Western de Fração Intracelular</i> .	41
3.4.4. <i>Isolamento da Sequência da Trealase Ácida de M. anisopliae</i> .....	44
<b>3.5. PERSPECTIVAS</b> .....	59
<b>4. CAPÍTULO 2</b> .....	60
<b>4.1. INTRODUÇÃO</b> .....	60
4.1.1. <i>Quitinases de Fungos</i> .....	60
4.1.2. <i>Quitinases de M. anisopliae</i> .....	66
<b>4.2. OBJETIVOS</b> .....	68
<b>4.3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	68
4.3.1. <i>Biominação por Quitinases no Genoma de M. anisopliae</i> .....	68
4.3.2. <i>Análise das Sequências de Quitinases Obtidas</i> .....	69
4.3.3. <i>Análises Filogenéticas das Quitinases</i> .....	69
<b>4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	70
4.4.1. <i>Biominação por Quitinases no Genoma de M. anisopliae</i> .....	70
4.4.2. <i>Classificação das Quitinases</i> .....	73
4.4.3. <i>Propriedades das Quitinases de M. anisopliae</i> .....	77
4.4.4. <i>Análises Filogenéticas das Quitinases</i> .....	88
<b>4.5. PERSPECTIVAS</b> .....	97
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	98
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	103

**ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Árvore filogenética das quitinases de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>121</b>
<b>Anexo 2.</b> Região central do alinhamento entre as quitinases preditas de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>122</b>
<b>Anexo 3.</b> Currículo Lattes.....	<b>125</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

%	Por cento
$\Delta$ (gene)	Linhagem com Deleção do Gene Subsequente
aa	aminoácido(s)
BD	Borda Direita do Vetor pPZP201BK
BE	Borda Esquerda do Vetor pPZP201BK
BSA	Albumina Sérica Bovina
°C	Graus Célcus
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzymes database</i>
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)
C-terminal	Carboxi-terminal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Dideoxynucleotídeo
EDTA	Sal Dissódico do Ácido Etilenodiaminotracético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> (Etiquetas de Sequências Expressas)
g	Grama, força gravitacional
GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
LB	Meio Luria-Bertani
mg	Miligrama
h	hora
kb	quilobase
kDa	quilodáton
M	Molar
mA	Miliampéres
MC	Meio de Cove
MCc	Meio de Cove Completo
MES	Ácido N-morfolino-etanosulfônico
mg/mL	Miligrama por mililitro

---

mL	Mililitro
mM	Milimolar
mOsmol/L	Miliosmol por Litro
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanogramas
nt	Nucleotídeo
N-terminal	Amino-terminal
ORF	<i>Open reading Frame</i> (Fase Aberta de Leitura)
PAGE	<i>Polyacrymalide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de Poliacrilamida)
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
UTR	<i>Untranslated Region</i> (Região não Traduzida)
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo Selvagem)
µg	Micrograma
µg/µL	Micrograma por Microlitro
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Espécies do Complexo <i>Metarhizium</i> .....	<b>6</b>
<b>Tabela 2.</b> Espécies de artrópodes suscetíveis à infecção por <i>M. anisopliae</i> , Ordem e Família e breve descrição.....	<b>8</b>
<b>Tabela 3.</b> Genes descritos no processo de infecção de <i>M. anisopliae</i> em seus hospedeiros.....	<b>21</b>
<b>Tabela 4.</b> Número de quitinases preditas nos genomas de fungos.....	<b>65</b>
<b>Tabela 5.</b> Propriedades das 23 quitinases preditas de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>78</b>
<b>Tabela 6.</b> Número de potenciais sítios de N-glicosilação em asparaginas preditos para cada quitinase de <i>M. anisopliae</i> E6.....	<b>80</b>
<b>Tabela 7.</b> Número de íntrons das quitinases de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cadáveres de artrópodes cobertos por conídios verdes após infecção por <i>M. anisopliae</i> .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Etapas da infecção de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da construção do plasmídeo pPZP::JAB::BAR.....	<b>38</b>
<b>Figura 4.</b> Confirmação da inserção dos <i>cassettes</i> contendo Jaburetox e o gene <i>bar</i> por amplificação das regiões correspondentes utilizando como molde DNA extraído de esporos em forno de microondas.....	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> Análise de proteínas intracelulares e de Jaburetox-2Ec nos transformantes (t139, t142, t151 e t156) e na linhagem selvagem E6.....	<b>43</b>
<b>Figura 6.</b> Reação primária e secundária para isolamento da região promotora do gene da trealase ácida por <i>Genome Walking</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 7.</b> Predição da ORF da trealase ácida de <i>M. anisopliae</i> pelo <i>software</i> FGENESH 2.6.....	<b>46</b>
<b>Figura 8.</b> Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da trealase ácida de <i>M. anisopliae</i> predita.....	<b>49</b>
<b>Figura 9.</b> Sequência de nucleotídeos contendo a região promotora da trealase ácida de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 10.</b> Comparação entre sequência de aminoácidos de trealases ácidas de fungos.....	<b>55</b>
<b>Figura 11.</b> Diagrama lógico da biomineração de quitinases no genoma de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>72</b>
<b>Figura 12.</b> Árvore filogenética das quitinases da família 18 de <i>M. anisopliae</i> e de <i>H. jecorina</i> .....	<b>76</b>
<b>Figura 13.</b> Sequência de aminoácidos que compõe o peptídeo sinal e o sítio de clivagem respectivo preditos (SignalP) para as quitinases de <i>M. anisopliae</i> e alinhamento dos mesmos.....	<b>81</b>
<b>Figura 14.</b> Presença dos domínios conservados SxGG e DxxDxDxE nas quitinases preditas de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>83</b>

---

<b>Figura 15.</b> Estrutura de domínios dos diferentes subgrupos das quitinases de <i>M. anisopliae</i> .....	<b>84</b>
<b>Figura 16.</b> Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo A de <i>M. anisopliae</i> e de outros fungos.....	<b>91</b>
<b>Figura 17.</b> Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo B de <i>M. anisopliae</i> e de outros fungos.....	<b>93</b>
<b>Figura 18.</b> Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo C de <i>M. anisopliae</i> e de outros fungos.....	<b>95</b>
<b>Figura 19.</b> Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo D de <i>M. anisopliae</i> e de outros fungos.....	<b>96</b>

## RESUMO

Dentre os agentes biocontroladores de insetos-praga, o fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* é considerado um organismo-modelo para o estudo das interações patógeno-hospedeiro devido a sua capacidade e eficiência para infectar inúmeros artrópodes. Seus hospedeiros compreendem pragas da agricultura, da pecuária e vetores de doenças humanas. A eficácia de *M. anisopliae* pode ser aumentada em relação ao tempo necessário para matar o hospedeiro em comparação ao controle químico. Uma alternativa é o desenvolvimento de linhagens melhoradas que sejam comercialmente viáveis e mais eficazes. Essa otimização pode ser obtida pela superexpressão de genes determinantes da virulência deste entomopatógeno ou de proteínas tóxicas inseticidas. Neste contexto, em uma primeira etapa do trabalho, desenvolvemos construções com o peptídeo entomotóxico Jaburetox-2Ec oriundo da leguminosa *Canavalia ensiformis* para potencializar a ação de *M. anisopliae* contra seus hospedeiros. O peptídeo foi utilizado na construção de um vetor para expressão da entomotoxina em linhagens recombinantes de *M. anisopliae*, obtidas por agrotransformação (transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*). A presença do peptídeo Jaburetox-2Ec (~13 kDa) na fração intracelular de quatro transformantes deste fungo foi detectada por ensaio de *Western blot*, no entanto o peptídeo apresentou-se em forma de agregados inativos com tamanho superior a 30 kDa. Também foi realizado o isolamento da região promotora e do peptídeo sinal presentes no gene da trealase ácida de *M. anisopliae* para permitir a expressão de Jaburetox fusionado a um peptídeo sinal de exportação celular e sob regulação do promotor da trealase ácida, o qual é induzido por trealose, o principal açúcar presente na hemolinfa de insetos. Em uma segunda etapa deste trabalho, foi realizado um estudo em escala genômica das quitinases putativas no genoma de *M. anisopliae*. Esta família de proteínas está diretamente envolvida na patogenicidade de *M. anisopliae*, e é responsável pela dissolução do exoesqueleto quitinoso dos hospedeiros, além de apresentarem função estrutural, morfológica, autolítica e nutricional em fungos e, portanto, potencialmente importante nas várias etapas do processo de infecção. A metodologia de biomineração realizada no genoma de *M. anisopliae* E6 permitiu identificar 23 quitinases preditas (incluindo as três quitinases isoladas experimentalmente CHIT42, CHI2 e CHIT30) pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases, classificando-as em quatro subgrupos filogenéticos sendo três destes propostos

anteriormente e o subgrupo D, proposto neste trabalho. Apresentamos uma análise detalhada da organização de domínios, peptídeos sinal e íntrons nestes genes *chi* propostos. Sendo *M. anisopliae* um entomopatógeno com alta capacidade de infecção, a determinação do número de quitinases que pode estar presente neste organismo e o estudo detalhado deste sistema quitinolítico representa uma perspectiva de estudo importante para o consequente melhoramento de linhagens deste fungo para potencializar o biocontrole. O biocontrole mais eficiente poderá resultar da seleção de linhagens com expressão aumentada de enzimas hidrolíticas, como as quitinases, que são fundamentais na penetração através do hospedeiro e da superexpressão de toxinas inseticidas na hemolinfa.

## ABSTRACT

Amongst pests biocontrol agents, the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae* is considered a model to study host-pathogen interactions due to its efficiency and capability to infect innumerous arthropods. *M. anisopliae* hosts ranges from agricultural and pasture pests to human disease vectors. *M. anisopliae* biocontrol efficacy can be enhanced and one of its major purposes is to overcome the actual existing limitations concerning the slow kill when compared to chemical control. Therefore, the development of cost-effective improved strains is highly desirable. This improvement can be performed by overexpressing fungal virulence genes or entomotoxic proteins. Thus, as the first part of the work we have undertaken the construction of strains expressing the highly potent insecticidal peptide Jaburetox-2Ec, originated from the leguminosae *Canavalia ensiformis* which may potentiate *M. anisopliae* action against its hosts. The peptide sequence was used to construct a toxin expression vector applicable to obtain recombinant *M. anisopliae* isolates through agrotransformation (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation). Jaburetox-2Ec (~13 kDa) was detected by Western blot assay at the fungal intracellular fraction in four recombinant isolates. The peptide was present as an inactive aggregated form with molecular mass superior to 30 kDa. We have also isolated and characterized the *M. anisopliae* acid trehalase promoter region and signal peptide in order to construct a vector that will allow a signal peptide-Jaburetox-2Ec fusion expression regulated by acid trehalase promoter, which is induced by the main insect haemolymph sugar (trehalose). The second part of the work aimed the description of the *M. anisopliae* putative chitinases in a genomic scale. Members of this protein family have been directly implicated in *M. anisopliae* pathogenicity, being responsible for host exoskeleton dissolution; in addition to the participation in structural, morphological, autolytic and nutritional activities related to the infection process. The bioinformatics methodology performed with the *M. anisopliae* genome was successful to identify 23 potential chitinases (including the three experimentally isolated chitinases CHIT42, CHI2 e CHIT30) belonging to glycoside hydrolase family 18 and classified into the three described chitinase subgroups and a proposed fourth subgroup. We performed detailed analyses of the domain organization, signal peptides and intron structure. For a highly infective entomopathogen as *M. anisopliae* the chitinase number determination and a more detailed study concerning this

chitinolytic system represents an important perspective for the consequent biocontrol strain improvement. Improved strains for biocontrol may result from the synergistic overexpression of hydrolytic enzymes, like host cuticle dissolvent chitinases that could be found screening the biodiversity, and by the expression of entomotoxins that act at host haemolymph.

## 1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* apresenta a capacidade de infectar uma ampla diversidade de hospedeiros artrópodes utilizando um mecanismo de infecção complexo e eficiente (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; ARRUDA *et al.*, 2005; SCHRANK & VAINSTEIN, 2010). O mecanismo que caracteriza a interação de *M. anisopliae* com seus hospedeiros tem sido alvo de abordagens experimentais diversas em nível molecular, celular, bioquímico e fisiológico que visam à elucidação deste processo. Essas abordagens, com destaque para a caracterização da função de genes isolados pela construção de mutantes nulos (WANG & ST. LEGER, 2006 e 2007a; FANG *et al.*, 2007 e 2009; WANG *et al.*, 2008; BOLDO *et al.*, 2009) e das análises de transcritos expressos em condições de infecção (FREIMOSER *et al.*, 2003 e 2005; DUTRA *et al.*, 2004, WANG *et al.*, 2005; FANG & BIDOCHKA, 2006; HE & XIA, 2009; ZHANG & XIA, 2009), ampliaram a compreensão dos processos biológicos envolvidos na infecção de artrópodes por entomopatógenos.

Esse esforço para descrever a biologia deste entomopatógeno está em parte vinculado à utilização deste organismo como agente biocontrolador de pragas da agricultura (SOUZA-GMES & MOSCARDI, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2003; BLANDFORD & THOMAS, 2001), da pecuária (ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000) e de vetores de doenças humanas (LACEY *et al.*, 1988; KAAYA & MUNYINYI, 1995; LUZ *et al.*, 1998; SCHOLTE *et al.*, 2005). A eficácia do biocontrole realizado por *M. anisopliae* pode ser aumentada e um dos objetivos a ser alcançado é a superação das limitações que ainda existem em relação ao tempo necessário para matar o hospedeiro em comparação ao controle químico. Uma alternativa é o desenvolvimento de linhagens melhoradas que sejam comercialmente viáveis e mais eficazes. A otimização pode ser efetuada pela superexpressão de genes que são determinantes da virulência deste entomopatógeno ou de proteínas tóxicas inseticidas (ST. LEGER *et al.*, 1996; WANG & ST. LEGER, 2007b; LU *et al.*, 2008; PAVA-RIPOLL *et al.*, 2008). Outras características importantes para a formulação de biocontroladores mais eficazes são a estabilidade e a persistência dos esporos no ambiente, a especificidade a uma determinada praga com pouca atividade contra outros alvos, a redução da carga de inóculo necessária, entre outras.

Além disso, devem ser consideradas as condições econômicas e ambientais que sejam satisfatórias para o desenvolvimento da formulação fúngica (INYANG *et al.*, 2000).

Apesar da caracterização do processo de infecção ter sido aprofundada e da consequente aplicação deste conhecimento já estar sendo realizada em estudos de campo (BAKER *et al.* 1994; SOUZA-GMES & MOSCARDI, 1998; LONG & HUNTER, 2005) e no desenvolvimento de linhagens modificadas (ST. LEGER *et al.*, 1996; WANG & ST. LEGER, 2007; PAVA-RIPOLL *et al.*, 2008), a pesquisa básica envolvendo o mecanismo molecular multifatorial deste entomopatógeno é ainda incompleta. A comparação dos genes e das proteínas entre fungos fitopatógenos, entomopatógenos, micopatógenos ou patógenos humanos, pode sugerir a conservação ou a divergência dos mecanismos de patogenia, o que auxilia na compreensão deste evento (YODER & TURGEON, 2001; ARVAS *et al.*, 2007).

A comparação de informações pode ser realizada em grande escala com os dados das análises genômicas pela detecção da presença ou ausência de genes com função já determinada em outros modelos (BRAUN *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2005; SOANES *et al.*, 2008). A presença de determinados genes pode indicar estratégias de ação microbiana e mecanismos de patogenia universais ou específicos, além de análises evolutivas entre os organismos (HSIANG & BAILLIE, 2006; STEINBERG & PEREZ-MARTIN, 2007). Em torno de 500 genomas de fungos estão sendo sequenciados (*GenomesOnline*, [www.genomesonline.org](http://www.genomesonline.org)) sendo 35 já finalizados e publicados e 454 genomas em fase de montagem e anotação. Essa diversidade de genomas catalogados ampliam os bancos de dados e fornecem informações novas, o que permite que comparações cada vez mais acuradas sejam efetuadas. Desta maneira, a atribuição da função gênica, a qual exige esforço experimental, pode ser beneficiada pelas análises prévias *in silico*. Além dos dados genômicos, a disponibilidade dos dados transcriptômicos e proteômicos com consequentes comparações em grande escala podem indicar novos objetivos a serem alcançados para melhorar a eficácia: (i) do biocontrole fúngico e também, (ii) do desenvolvimento de novas metodologias de defesa contra patógenos humanos.

Em *M. anisopliae* já foram realizadas comparações de expressão diferencial de genes entre diferentes linhagens. A análise de genes com diferenças na expressão entre uma linhagem generalista e uma linhagem de ação mais específica (especialista) apresentou diferentes famílias de proteínas sendo utilizadas por cada uma das linhagens em

condições específicas (FREIMOSER *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2005). Ainda, hibridizações genômicas entre essas linhagens detectaram diferenças menores do que 5%, entretanto, entre os genes pouco conservados na linhagem especialista estão alguns dos necessários à sobrevivência em hospedeiros alternativos ou como saprófito (ST. LEGER, 2007; WANG *et al.*, 2009). Já foram descritas, também, comparações da expressão diferencial de transcritos em condições que mimetizaram o saprofitismo e a infecção em carrapatos (DUTRA *et al.*, 2004).

Uma das famílias de proteínas que parece estar diretamente envolvida na patogenicidade de *M. anisopliae* são as quitinases. Estas enzimas são responsáveis pela dissolução do exoesqueleto quitinoso dos hospedeiros, além de apresentarem função estrutural, morfológica, autolítica e nutricional em fungos (ADAMS, 2004). Nosso grupo tem se dedicado ao estudo celular e molecular de *M. anisopliae* durante o processo de infecção em seus hospedeiros e na interação fungo/hospedeiro. Recentemente, demonstramos a importância da quitinase CHI2 no processo de infecção de *M. anisopliae*, já que mutantes deletados para este gene apresentaram uma diminuição da virulência contra o hospedeiro *Dysdercus peruvianus*, e linhagens que superexpressaram esta quitinase foram mais virulentas (BOLDO *et al.*, 2009). Ainda, a deleção do gene *chi3*, que codifica a quitinase CHIT30 (PINTO *et al.*, 1997; DA SILVA *et al.*, 2005) resultou em diminuição da virulência contra *D. peruvianus* (STAATS, 2007).

Análises genômicas e bancos de dados de genomas sequenciados apresentam um número grande de quitinases putativas em fungos filamentosos (SEIDL *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2008; NCBI, BROAD Institute). Seidl *et al.* (2005) detectaram 18 quitinases no fungo micopatógeno *Trichoderma reesei*. Essa expansão no número de quitinases descritas em diferentes organismos estimula o estudo mais aprofundado da função exercida por essas proteínas. Sendo *M. anisopliae* um entomopatógeno com alta capacidade de infecção, a determinação do número de quitinases que pode estar presente neste organismo e o estudo detalhado deste sistema quitinolítico representa uma perspectiva de estudo importante, tanto para a melhor compreensão do processo de infecção quanto para o consequente melhoramento de linhagens deste fungo para um biocontrole mais eficiente.

## 1.1. *METARHIZIUM ANISOPLIAE*: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Isolado a partir de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*, o fungo filamentoso ascomiceto *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales:Clavicipitaceae) foi descrito em 1879 por Metschnikoff. Desde então, já foram relatadas mais de 300 espécies de hospedeiros artrópodes infectadas por este fungo, o qual é um dos entomopatógenos mais comumente isolado a partir de insetos (CHARNLEY, 1991). Esta característica contribuiu para que este fungo passasse a ser considerado um modelo para o estudo das interações que ocorrem entre entomopatógenos e seus hospedeiros e para ser amplamente utilizado como um agente biocontrolador de pragas.

Em uma análise filogenética multigênica recente, Bischoff *et al.* (2009) propuseram uma nova classificação do Complexo *Metarhizium*. Esta proposta eleva o reconhecimento de variedades para o nível de espécies no gênero *Metarhizium*, que os autores propõem passar a compreender onze espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. brunneum*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. globosum*, *M. robertsii*, *M. flavoviride* e *M. frigidum*. Além das espécies estudadas neste trabalho, ainda existem descrições para outras 17 espécies contidas no Banco de Dados de Fungos – Banco de Espécies e Nomenclatura ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)). Uma lista com a classificação das espécies deste gênero pode ser observada na Tabela 1.

As espécies anamórficas foram relacionadas com teleomorfos do gênero *Cordyceps* (LIANG *et al.* 1991; LIU *et al.*, 2002). Atualmente, as três espécies teleomórficas de *Metarhizium* já descritas são *C. brittlebankisoides* (LIU *et al.*, 2001), *C. campsosterni* (ZHANG *et al.* 2004) e *C. taii* (LIANG *et al.* 1991). Após, Sung *et al.* (2007) sugeriram transferir o tipo sexual do gênero *Cordyceps* para o gênero *Metacordyceps* (Tabela 1).

*M. anisopliae* apresenta distribuição geográfica mundial e é conhecido como causador da infecção fúngica chamada *green muscardine*, baseada na incrustação dos cadáveres de artrópodes com conídios verdes (ROBERTS & ST. LEGER, 2004). Na Figura 1 pode ser observada a infecção característica de *M. anisopliae* sob dois hospedeiros suscetíveis. O gênero *Metarhizium* infecta um amplo espectro de hospedeiros com alguns isolados apresentando maior grau de especificidade (CLARKSON & CHARNLEY, 1996) como, por exemplo, *M. acridum*, que infecta preferencialmente

gafanhotos (BRIDGE *et al.*, 1997). Este fungo também é capaz de sobreviver na rizosfera (HU & ST. LEGER, 2002).

Como um modelo de estudo para fungos entomopatógenos *M. anisopliae* apresenta algumas vantagens como: bancos de dados oriundos de bibliotecas de etiquetas de sequências expressas (ESTs) (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005; HE & XIA, 2008; ZHANG & XIA, 2008 e 2009) e de análises por microarranjos (FREIMOSER *et al.*, 2005; WANG & ST. LEGER, 2005; WANG *et al.*, 2009); disponibilidade de promotores caracterizados que permitem a expressão de genes de interesse (NAKAZATO *et al.*, 2006), tecnologia de interrupção de genes para análise funcional (STAATS *et al.*, 2007; BOLDO *et al.*, 2009). Essas ferramentas ainda podem ser aplicadas nos diferentes tipos celulares apresentados por *M. anisopliae*: conídios, hifas, apressórios e blastosporos uni e multicelulares.



**Figura 1. Cadáveres de artrópodes cobertos por conídios verdes após infecção por *M. anisopliae*. Fêmea do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (A) e fêmea do percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (B).**

**Tabela 1. Espécies do Complexo *Metarhizium*.**

Nova nomenclatura (BISCHOFF <i>et al.</i> , 2009)	Nomenclatura anterior
<i>M. anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. 1883	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
<i>M. guizhouense</i> Q.T. Chen & H.L. Guo 1986	=
<i>M. pingshaense</i> Q.T. Chen & H.L. Guo 1986	=
<i>M. brunneum</i> Petch 1935	=
<i>M. acridum</i> (Driver & Milner) JF. Bisch., Rehner & Humber stat. nov.	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>
<i>M. lepidiotae</i> (Driver & Milner) JF. Bisch., Rehner & Humber stat. nov.	<i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotae</i>
<i>M. majus</i> (JR. Johnst.) JF. Bisch., Rehner & Humber stat. nov.	<i>M. anisopliae</i> var. <i>major</i>
<i>M. globosum</i> JF. Bisch., Rehner & Humber sp. nov.	-
<i>M. robertsii</i> JF. Bisch., Rehner & Humber sp. nov.	-
<i>M. flavoviride</i> W. Gams & Rozsypal 1973	=
<i>M. frigidum</i> J. Bischoff & SA. Rehner 2007	=
Espécies descritas no <i>Mycobank</i> e não analisadas no trabalho de Bischoff <i>et al.</i> (2009)	
<i>M. album</i> Petch 1931	
<i>M. chrysorrhoeae</i> Giard 1889	
<i>M. cicadinum</i> (Höhn.) Petch 1931	
<i>M. cylindrosporium</i> Q.T. Chen & H.L. Guo 1986	
<i>M. coleoptera</i> ined.	
<i>M. gigas</i> Sorokin 1883	
<i>M. glutinosum</i> S.A. Pope 1944	
<i>M. iadini</i> H.L. Guo 1991	
<i>M. leptophyei</i> Giard 1888	
<i>M. libelullae</i> Sorokin 1883	
<i>M. novaezealandicum</i> (Driver & Milner) ined.	
<i>M. locustidae</i> ined.	
<i>M. polistis</i> Cohn ex Sorokin 1883	
<i>M. viridulum</i> (Tzean, L.S. Hsieh, J.L. Chen & W.J. Wu) B. Huang & Z.Z. Li 2004	
<i>M. viridicolumnare</i> (Matsush.) Matsush. 1993	
<i>M. velutinum</i> Borowska, Golonk. & Kotulowa 1970	
<i>M. truncatum</i> (Briard) Petch 1931	
Teleomórfos relacionados à <i>Metarhizium</i>	Nova nomenclatura (SUNG <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cordyceps brittlebankisoides</i> (LIU <i>et al.</i> , 2001)	<i>Metacordyceps brittlebankisoides</i>
<i>C. campsosterni</i> (ZHANG <i>et al.</i> 2004)	<i>Metacordyceps campsosterni</i>
<i>C. taii</i> (LIANG <i>et al.</i> 1991)	<i>Metacordyceps taii</i>

## 1.2. BIOCONTROLE POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Biocontrole é a utilização de um organismo predador sobre um organismo hospedeiro suscetível, e está baseado na relação ecológica existente entre espécies que são inimigos naturais (ENGLER & ROGOFF, 1976). A manipulação dessa característica natural foi realizada pelo homem com o objetivo de controlar os efeitos causados por pragas há muito anos. Lord (2005) comenta que já em 1879, Metschnikoff, na tentativa de diminuir a grande perda econômica causada pela infestação das plantações de cereais com o besouro *A. austriaca*, sugeriu a produção, dispersão e aplicação de conídios de *M. anisopliae* para promover o biocontrole.

Existem mais de 700 espécies de entomopatógenos, sendo as espécies dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* aquelas mais frequentemente utilizadas no biocontrole. *M. anisopliae* já foi identificado em insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera e Hemiptera (CHARNLEY, 1991) entre outras. Algumas linhagens de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Veuillemin e *M. anisopliae* infectam quase todas as ordens de insetos mencionadas e, por isso, grande atenção é despendida ao estudo desses gêneros, os quais são cosmopolitas. A Tabela 2 apresenta exemplos de artrópodes-pragas que são hospedeiros de *M. anisopliae*.

Os artrópodes são o grupo mais abundante e diverso sobre a terra, com um número de espécies estimado entre 4 e 6 milhões (NOVOTNY *et al.*, 2002), e são infectados por inúmeros patógenos como vírus e bactérias. Entretanto, a maioria das infecções em insetos é causada por fungos. O impacto dessa relação na população de insetos demonstra o potencial de utilização de biocontrole dos insetos de interesse médico e agrônômico. Os fungos entomopatógenos são, portanto, fatores essenciais na regulação da população de pragas. Ao contrário de bactérias e vírus que devem ser ingeridos para estabelecer a infecção, os fungos infectam os insetos por penetração direta através da cutícula. Deste modo, são uma alternativa única para o controle de insetos que sugam extratos vegetais e animais (seu aparato bucal não permite a passagem de bactérias) e para muitos coleópteros que não apresentam infecções causadas por bactérias ou vírus descritas (ROBERTS, 1989; CHARNLEY, 1991; HAJEK & ST. LEGER, 1994).

**Tabela 2. Espécies de artrópodes suscetíveis à infecção por *M. anisopliae*, Ordem e Família e breve descrição.**

<b>Espécie hospedeira</b>	<b>[Ordem:Família]</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referências</b>
<i>Anopheles gambiae</i>	[Diptera:Culicidae]	Vetor da malária	Scholte <i>et al.</i> , 2004
<i>Culex quinquefasciatus</i>	[Diptera:Culicidae]	Transmissor da filariose	Lacey <i>et al.</i> , 1988
<i>Musca domestica</i>	[Diptera:Muscidae]	Mosca	Barson <i>et al.</i> , 1994
<i>Glossina spp.</i>	[Diptera:Glossinidae]	Mosca tse-tsé	Kaaya & Munyinyi, 1995
<i>Ceratitis capitata</i>	[Diptera:Tephritidae]	Mosca das frutas	Mochi <i>et al.</i> , 2006
<i>Zaprionus indianus</i>	[Diptera:Drosophilidae]	Mosca-do-figo	Svedese <i>et al.</i> , 2005
<i>Anastrepha ludens</i>	[Diptera:Tephritidae]	Mosca das frutas mexicana	Lezana-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2000
<i>Dysdercus peruvianus</i>	[Hemiptera:Pyrrhocoridae]	Percevejo manchador do algodão	Lubëck <i>et al.</i> , 2008
<i>Mahanarva fimbriolata</i>	[Hemiptera:Cercopidae]	Cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar	Almeida <i>et al.</i> , 2003
<i>M. posticata</i>	[Hemiptera:Cercopidae]	Cigarrinha da folha da cana-de-açúcar	Filho <i>et al.</i> , 2003
<i>Bemisia tabaci</i>	[Hemiptera:Aleyrodidae]	Mosca branca do tabaco	Batta, 2003
<i>Triatoma infestans</i>	[Hemiptera:Reduviidae]	Transmissor da doença de Chagas	Luz <i>et al.</i> , 1998
<i>Vatiga illudens</i>	[Hemiptera:Tingidae]	Percevejo-da-renda	Oliveira <i>et al.</i> , 2001
<i>Deois flavopicta</i>	[Homoptera:Cercopidae]	Cigarrinha das pastagens	Teixeira <i>et al.</i> , 2007
<i>Tetranychus evansi</i>	[Acarina:Tetranychidea]	Ácaro vermelho	Wekesa <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypothenemus hampei</i>	[Coleoptera:Scolytidae]	Broca do café	Bustillo <i>et al.</i> , 1999
<i>Chalcodermus bimaculatus</i>	[Coleoptera:Curculionidae]	“Manhoso”	Quintela <i>et al.</i> , 1992
<i>Capnodis tenebrionis</i>	[Coleoptera:Buprestidae]	“Flatheaded peachborer”	Marannino <i>et al.</i> , 2006
<i>Diploschema rotundicolle</i>	[Coleoptera:Cerambycidae]	Broca dos citros	Machado & Filho, 2006
<i>Blatella germanica</i>	[Dyctioptera:Blattellidae]	Barata	Quesada-Moraga, 2004
<i>Schistocerca gregaria</i>	[Orthoptera:Acrididae]	Gafanhoto do deserto	Nowierski <i>et al.</i> , 1996
<i>Manduca sexta</i>	[Lepidoptera:Sphingidae]	Lagarta da folha do tabaco	St. Leger <i>et al.</i> , 1996

Existe uma grande preocupação em reduzir o dano ambiental causado pelo uso de inseticidas químicos (HILL & SENDASHONGA, 2006). A utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas da agricultura e da pecuária apresenta-se como uma alternativa ambientalmente correta ao uso de tratamentos químicos. O uso intensivo de agrotóxicos tem promovido diversos problemas de ordem ambiental como a contaminação dos alimentos, da água, do solo e dos animais; a intoxicação de agricultores, a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos, o surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxico), o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica, a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade de outros (MORANDI & BETTIOL, 2009).

As vantagens do biocontrole sobre os pesticidas químicos incluem a alta especificidade aos hospedeiros, a baixa toxicidade para outros organismos e o baixo impacto ambiental. Além disso, devido ao processo de infecção multifatorial realizado pelos fungos, a probabilidade dos insetos adquirirem resistência é menor ou mais lenta do que a resistência adquirida aos pesticidas (HE & XIA, 2008). Em 1992, a Organização Mundial de Saúde reportou que mais de 500 espécies de insetos e ácaros desenvolveram resistência a uma ou mais classes de inseticidas (GEORGHIOU, 1990; *World Health Organization*, 1992). Há uma necessidade urgente de identificar bioinseticidas (NICHOLSON, 2007), já que a alta resistência adquirida por diversos vetores de doenças humanas indica uma perspectiva de re-emergência dessas doenças.

Para aproveitar o enorme potencial biocontrolador de *M. anisopliae*, questões de ordem prática estão sendo consideradas e estudadas como, por exemplo: a produção de esporos em massa e o desenvolvimento de formulações eficazes, a otimização da aplicação do inóculo, a dispersão dos conídios e a sua viabilidade após a aplicação no ambiente (persistência), a virulência da linhagem utilizada frente ao hospedeiro alvo e principalmente o tempo, considerado longo, que *M. anisopliae* leva para matar seu hospedeiro (ENGLER & ROGOFF, 1976; FUXA, 1987; ST. LEGER *et al.*, 1996; INYANG *et al.*, 2000).

O conhecimento dos mecanismos de patogênese do fungo sobre os insetos ajudará na produção de micoinseticidas mais eficientes, tanto pela identificação de novos

determinantes de virulência, quanto pela identificação de genes que possam ser superexpressos ou manipulados para melhorar a virulência.

Reduzir o tempo entre a penetração do fungo e a morte do hospedeiro é importante, pois as linhagens selvagens de entomopatógenos determinam a morte do hospedeiro num período de cinco a dez dias (ST. LEGER *et al.*, 1996; FRAZZON *et al.*, 2000), durante o qual o inseto praga pode continuar se alimentando e causando prejuízos. Entretanto, apesar da morte de artrópodes causada por biocontroladores ocorrer mais lentamente, o dano às plantações é diminuído durante o período da infecção porque os insetos infectados diminuem a alimentação (TEFERA & PRINGLE, 2003). Entre as alternativas que podem ser utilizadas para aperfeiçoar o biocontrole está a utilização da superexpressão de genes determinantes de virulência (ST. LEGER *et al.*, 1996), a expressão de proteínas inseticidas (WANG & ST. LEGER, 2007; PAVA-RIPOLL *et al.*, 2008) e a utilização de dois agentes de biocontrole, os quais podem apresentar ação sinérgica sobre o hospedeiro (LUTZ *et al.*, 2004; ANSARI *et al.*, 2006)

Um dos exemplos do uso de *M. anisopliae* como biocontrolador é o projeto LUBILOSIA (*LUtte Biologique contre les LOcustes et SAuteriaux*: [www.lubilosa.org](http://www.lubilosa.org)). Foi utilizada uma linhagem africana da variedade *acridum* para desenvolver o inseticida *Green muscle*, o qual é específico para gafanhotos, apresenta alta resistência a UV e sua formulação em óleo contribuiu para evitar a dessecação. Dados afirmam que houve uma redução de 65-97% dentro de 8-11 dias da população de gafanhotos migratórios em aplicações em campo (LOMER *et al.*, 1999). Além disso, utilizando uma linhagem altamente virulenta contra ácaros e sem efeitos contra abelhas, foi realizado o biocontrole destas pragas (que adquiriram resistência ao pesticida químico) que estavam infestando e destruindo inúmeras colônias de abelhas. A maior parte dos ácaros foi morta em 3 a 5 dias e o fungo foi efetivo mesmo após 42 dias da aplicação (LONG & HUNTER, 2005; ST. LEGER, 2007).

De Faria & Wraight (2007) elaboraram um lista com inúmeras formulações comerciais de micopesticidas desenvolvidos desde 1960. Produtos baseados em *B. bassiana* (33,9%), *M. anisopliae* (33,9%), *Isaria fumosorosea* (5,8%) e *B. brongniartii* (4,1%) são os mais comuns entre 171 produtos listados no trabalho. Aproximadamente 43% de todos os produtos foram desenvolvidos por empresas ou instituições da América do Sul e os autores citam que o maior programa de controle microbiano (até 2007) envolve

a utilização de *M. anisopliae* para controlar as cigarrinhas em plantações de cana-de-açúcar na América do Sul e Central. Em uma única operação em cana-de-açúcar, este fungo é anualmente aplicado sobre 60.000 hectares para controlar *Mahanarva fimbriolata*. No Brasil, das 26 formulações baseadas em *M. anisopliae*, 20 são ativas e 6 já não são mais comercializadas.

### 1.3. MECANISMO DE INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA

Os insetos estão continuamente expostos a diversos patógenos; entretanto, apresentam sistemas de defesa eficientes contra seus parasitas. Este sistema é basicamente composto de: (i) barreiras físicas à infecção, como o exoesqueleto rígido e o intestino médio revestido pela membrana peritrófica; (ii) respostas coordenadas de hemócitos que atuam quando as primeiras barreiras são ultrapassadas e (iii) indução de síntese de peptídeos antimicrobianos e outras proteínas a partir do corpo gorduroso (GILLESPIE *et al.*, 1997).

Para sobrepujar tais defesas, *M. anisopliae* e outros fungos entomopatógenos, evoluíram um mecanismo de infecção bastante eficaz. As principais etapas do ciclo de infecção são: a adesão do esporo sobre a cutícula de um hospedeiro suscetível, a germinação do esporo e a formação do apressório na extremidade da hifa, a penetração do fungo através das camadas da cutícula do inseto, a diferenciação morfológica do fungo em corpos hifais (ou blastosporos) que se disseminam na hemocele do inseto, a extrusão de hifas novas sobre o exoesqueleto do hospedeiro e a disseminação dos novos conídios formados (ARRUDA *et al.*, 2005) (Figura 2).

Para uma infecção produtiva o fungo deve se adaptar a condições distintas que incluem uma barreira epicuticular hidrofóbica rica em ceras, a procutícula rica em fibras de quitina, a hipoderme celular e, finalmente, a hemolinfa rica em solutos e células de defesa (FREIMOSER *et al.*, 2005). Cada passo requer uma reprogramação do perfil de expressão de vários genes incluindo aqueles necessários para a degradação da cutícula, produção de toxinas, resposta a estresse e reorganização celular (WANG *et al.*, 2007). De maneira geral, os fatores que auxiliam na virulência de *M. anisopliae* atuam em duas etapas principais: (i) na adesão e penetração através das camadas da cutícula do inseto e (ii) nas

alterações morfo-fisiológicas com consequente desenvolvimento em corpos hifais (blastosporos) na hemolinfa do inseto.

Os fatores que são necessários ao processo de infecção são considerados determinantes da virulência do fungo. Este conceito se aplica aqueles genes cuja função, quando suprimida, altera significativamente o desempenho de um microrganismo, geralmente diminuindo sua capacidade infectiva. Já foram caracterizados alguns genes determinantes de virulência para cada uma das etapas de infecção deste fungo, os quais são descritos a seguir e estão listados na Tabela 3.

#### *Etapa 1 - Adesão do esporo fúngico sobre a cutícula dos hospedeiros*

A adesão do esporo fúngico sobre a epicutícula do hospedeiro é uma etapa decisiva para o estabelecimento da infecção. O sucesso de um entomopatógeno pode ser determinado pela sua habilidade de produzir, liberar e aderir seus propágulos infecciosos sob a cutícula de um hospedeiro suscetível. Por sua vez, a adesão depende da estrutura e das propriedades químicas e físicas destes propágulos (BOUCIAS & PENDLAND, 1991). O reconhecimento de um hospedeiro suscetível inclui aspectos químicos e topográficos (PEDRINI *et al.*, 2006). Diferenças na composição da cutícula dos hospedeiros resultam em diferenças na germinação dos conídios aderidos, na formação de apressório e consequentemente na virulência das linhagens (WANG & ST. LEGER, 2005; JARROLD *et al.*, 2007).

Um dos fatores determinantes para a adesão de *M. anisopliae* na epicutícula do hospedeiro é a proteína MAD1, uma adesina que está presente na superfície do esporo. Mutantes nulos para este gene apresentaram esporos com capacidade adesiva diminuída em ensaios de adesão sobre cutícula de gafanhotos. Apenas 5,3% dos conídios da linhagem  $\Delta$ Mad1 aderiram em comparação a >90% do tipo selvagem (WANG & ST. LEGER, 2007a). A deleção de outro gene, *MaPKA1* (codifica a subunidade catalítica 1 da proteína quinase A), também afetou a adesão dos esporos sobre cutícula de larvas de *Galleria mellonella* de maneira que, 16 horas após a inóculo, apenas 15% dos esporos aderiram sob a cutícula das larvas em comparação a 92% de adesão dos esporos da linhagem selvagem (FANG *et al.*, 2009).

Outra classe de proteínas que estão relacionadas à adesão às superfícies cuticulares dos artrópodes hospedeiros são as hidrofobinas. Estas proteínas são ricas em cisteínas e

apresentam baixa massa molecular, são produzidas apenas por fungos e estão ligadas à parede celular ou são secretadas (BOUCIAS, *et al.*, 1988; WESSELS, 2000). Devido a sua característica anfipática, é sugerido que as hidrofobinas auxiliem a promover a adesão do esporo hidrofóbico às cutículas dos hospedeiros.

Recentemente, foi proposto que as lipases têm um papel fundamental na infecção, já que após tratamentos com inibidores de lipases a infecção de *M. anisopliae* sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus* foi impedida (SILVA *et al.*, 2009). As lipases seriam as primeiras enzimas atuantes no processo, auxiliando na degradação da camada mais externa dos hospedeiros, acima da epicutícula, a qual é composta por ceras. A adição de extratos epicuticulares contendo substâncias lipídicas a meios de cultivo induziu a germinação e formação do apressório em *M. anisopliae* (MENT *et al.*, 2009).

Outro fator que parece atuar na etapa de adesão é a proteína CWP10 de *M. anisopliae*. Após detectar esta proteína em ensaios de extração de proteínas ligadas a parede celular, a mesma foi expressa no fungo *B. bassiana*. A linhagem de *B. bassiana* expressando CWP10 apresentou 10,8% de aumento da hidrofobicidade do conídio; e a sua capacidade adesiva a superfícies hidrofóbicas aumentou 1,3 vezes. Este fato sugere que outras proteínas, além das hidrofobinas, podem contribuir para a característica hidrofóbica do conídio (LI *et al.*, 2005).

#### *Etapa 2 - Formação do apressório*

Esta etapa é determinante para o estabelecimento da infecção realizada por *M. anisopliae*, pois ocorre a diferenciação da extremidade distal de suas hifas em apressório. O apressório é a estrutura fúngica especializada na penetração dos hospedeiros (entomo e fitopatógenos) através das carapaças e/ou parede celular. Este processo morfogênico envolve o crescimento polarizado, a dilatação do ápice da hifa e o reforço da parede celular (CLARKSON & CHARNLEY, 1996).

A penetração ocorre por ação combinada de pressão mecânica e da secreção de um conjunto de enzimas hidrolíticas (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Algumas das enzimas hidrolíticas que participam deste processo são consideradas fatores determinantes da virulência do fungo, como a protease Pr1A (ST. LEGER *et al.*, 1987), e a quitinase CHI2 (BOLDO *et al.*, 2009). Linhagens que superexpressaram a quitinase CHI2 foram mais virulentas em comparação ao tipo selvagem frente ao hospedeiro *D. peruvianus*. Isto

é reforçado pelo fato de que mutantes para este único gene apresentaram virulência reduzida, o que confirma a importância desta proteína no processo de infecção. Além desta, mutantes para a endo-exo-quitinase, codificada pelo gene *chi3*, também resultaram em menor virulência contra *D. peruvianus* quando comparada ao tipo selvagem (STAATS, 2007).

A formação do apressório mostrou-se diretamente dependente da presença da proteína MPL1, uma perilipina de *M. anisopliae* que é responsável pela formação das vesículas lipídicas que geram o turgor do apressório (WANG & ST. LEGER, 2007). Mutantes deste gene apresentaram diminuição no número de vesículas lipídicas, tubos germinativos mais finos e pressão de turgor do apressório dramaticamente reduzida, o que corrobora com a diminuição da virulência observada nestes mutantes em bioensaios contra larvas de *Manduca sexta*.

A deleção da subunidade catalítica 1 da proteína quinase A (PKA) de *M. anisopliae* (MaPKA1) resultou em desenvolvimento fúngico reduzido, defeitos na formação do apressório e virulência severamente diminuída contra *G. mellonella* (WANG *et al.*, 2009). Os autores sugerem que esta proteína seja uma reguladora máster dos genes determinantes de virulência, e sugerem que o fato do mutante ser quase avirulento resulta dos efeitos pleiotrópicos das funções de desenvolvimento fúngico serem controladas pela PKA. A deleção desta enzima fundamental para a fosforilação de inúmeras outras proteínas, pode afetar os processos biológicos mais básicos do organismo (metabolismo de açúcares, glicogênio e lipídios) e, conseqüentemente, até a virulência do organismo, fato que não necessariamente a caracteriza como uma reguladora máster de virulência.

Além disso, Hu & Xia (2009) detectaram, em ensaios de germinação e formação de apressório sobre asas de *Locusta migratoria*, que em algumas regiões das asas deste inseto todos os conídios germinados se diferenciaram em apressórios e em outras regiões houve um crescimento extensivo das hifas antes da formação dos apressórios. Eles sugerem que este fato pode ser consequência de uma distribuição desigual dos componentes cuticulares ou uma diferença na topografia entre diferentes partes da asa.

### *Etapa 3 – Diferenciação celular na hemolinfa do hospedeiro*

Ao entrar em contato com a hemolinfa ocorre uma nova diferenciação celular de *M. anisopliae*, o qual assume a forma de corpos hifais, que são hifas unicelulares de pequenos

comprimentos (mas maiores que os conídios) ou blastosporos similares aos de leveduras. Dentre os diversos tipos celulares formados por *M. anisopliae*, os corpos hifais são importantes para escapar ao sistema imune dos hospedeiros e atuar de maneira eficaz no ambiente da hemolinfa. Estes tipos celulares representam o principal estágio de replicação do fungo no interior da hemocele do inseto, auxiliando na dispersão fúngica e na colonização do hospedeiro pela otimização na aquisição de nutrientes por aumento da área de superfície (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; ZHANG & XIA, 2009).

Os hemócitos do hospedeiro são capazes de reconhecer e fagocitar os conídios mais facilmente do que os blastosporos. Esta habilidade em evitar a detecção pelo sistema imune dos insetos está relacionada com a proteína Mcl1. Em *M. anisopliae*, após 20 minutos de contato com a hemolinfa, há a detecção de transcritos do gene *Mcl1*, o qual codifica uma proteína tipo colágeno, que funciona como uma capa protetora antiadesiva contra a fagocitose e o encapsulamento por hemócitos. Esta capa mascara os componentes imunogênicos da parede celular do fungo, as  $\beta$ -glicanas. Os blastosporos da linhagem mutante para este gene são rapidamente reconhecidos por hemócitos e também apresenta virulência reduzida contra larvas de *M. sexta*. (WANG & St. LEGER *et al.*, 2006).

A hemolinfa é rica em solutos e apresenta uma pressão osmótica de 300 a 500 mOsmol/l, que por si constitui uma condição de estresse (CHAPMAN, 1998). Para transpor essa barreira, *M. anisopliae* sintetiza uma proteína osmosensora, codificada pelo gene *Mos1* (WANG *et al.*, 2007), que atua na etapa em que o fungo está na hemolinfa do hospedeiro. O silenciamento (RNAi) deste gene provocou atraso na germinação dos esporos, na formação de apressórios irregulares e maior sensibilidade ao estresse oxidativo e à perturbação da biossíntese de parede celular. Os autores sugerem que esses efeitos pleiotrópicos podem ter sido causados pela relação de *Mos1* com a via de sinalização das MAP quinases, a qual está envolvida numa ampla gama de funções biológicas, incluindo desenvolvimento, resposta a estresse oxidativo e virulência.

Uma fosfocetolase de origem bacteriana (Mpk1), presente em *M. anisopliae*, também parece estar envolvida na colonização do hospedeiro. Sabe-se que as fosfocetolases bacterianas têm função no catabolismo da via das pentoses. Os níveis de transcritos do gene *mpk1* de *M. anisopliae* estão aumentados quando o fungo é cultivado em hemolinfa de *M. sexta*, e também são relativamente maiores do que os níveis

detectados em cultivos contendo cutícula ou pobre em nutrientes. A deleção deste gene diminui a virulência contra larvas de quinto ínstar deste hospedeiro (DUAN *et al.*, 2009).

Uma das proteínas detectadas em sobrenadantes de cultivo de *M. anisopliae* e que pode estar sendo secretada na hemolinfa durante a infecção, é uma tirosina fosfatase (PTPase). Estas enzimas hidrolisam grupos fosfatos ligados a resíduos de tirosina em diversas proteínas. Pra realizar um ensaio de atividade da tirosina fosfatase sobre as proteínas de *Locusta migratoria*, algumas fosfoproteínas presentes na hemolinfa deste inseto foram purificadas. A PTPase de *M. anisopliae* parece ter como alvo uma fosfoproteína de *L. migratoria* que apresenta homologia com a fosfoproteína *trans*Golgi p230 de humanos. Essa proteína, em humanos, interage com uma proteína ligadora de actina e microtúbulos e pode estar envolvida no transporte de proteínas do Golgi para a membrana plasmática. Os autores sugerem que a inativação da fosfoproteína de *L. migratoria* causada por defosforilação pela PTPase pode interferir no transporte correto de proteínas funcionais secretadas pelo inseto, como a transferrina, que acredita-se participar da resposta imune inata neste inseto (LI *et al.*, 2008).

Depois que o fungo atinge a hemolinfa, as destruxinas (DTXs), uma família de depsipeptídeos cíclicos que apresentam toxicidade a insetos, são produzidas. As DTXs são os principais metabólitos secundários produzidos por *M. anisopliae*. Esses peptídeos são detectados nos insetos a partir de três dias após o inoculo fúngico e a concentração das DTXs aumenta atingindo níveis máximos imediatamente antes da morte dos hospedeiros (SKROBEK *et al.*, 2008). Entretanto, apesar de ter sido observado que várias espécies do gênero *Metarhizium* foram patogênicas contra os hospedeiros examinados indiferentemente do fato de produzirem ou não as destruxinas (KERSHAW *et al.*, 1999), outros trabalhos demonstram a participação das DTXs no processo de infecção (PAL *et al.*, 2007; SREE & PADMAJA, 2008; SREE *et al.*, 2008). A destruxina A de *M. anisopliae* apresenta um papel na supressão da resposta imune humoral em insetos (PAL *et al.*, 2007).

Extratos contendo DTXs de *M. anisopliae* induziram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando estresse oxidativo, detectado pelo aumento da atividade das proteínas detoxificantes e pela peroxidação lipídica em larvas de *Spodoptera frugiperda*. Após 1 hora de tratamento com concentrações crescentes de DTXs, a atividade total das enzimas de detoxificação (superóxido desmutase, catalase, glutatona peroxidase e ascorbato peroxidase) foi elevada, sugerindo a presença de um sistema de detoxificação

eficiente. Entretanto, após 48 horas de tratamento, a atividade destas enzimas diminuiu e o estresse oxidativo atingiu níveis máximos. Além disso, os extratos produziram um decréscimo dose-dependente no peso corporal das larvas após tratamentos (SREE & PADMAJA, 2008).

Em relação à assimilação de nutrientes por parte do fungo, Seyoum *et al.* (2002) demonstram que há um declínio significativo nos níveis de carboidratos e lipídeos da hemolinfa de *Schistocerca gregaria* infectada por *M. anisopliae*. Este declínio é consistente com a aquisição fúngica das reservas energéticas do hospedeiro durante o processo de micose. Além disso, *M. anisopliae* secreta uma trealase ácida na hemolinfa para utilizar a trealose como fonte de carbono. A trealose é o principal açúcar presente na hemolinfa dos insetos (XIA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2006).

#### *Etapa 4 – Extrusão do micélio e conidiação*

Uma vez exauridos os nutrientes do hospedeiro pelo fungo, os órgãos internos do hospedeiro se decompõem devido à perda da integridade das membranas celulares e dos fluidos. Após a morte do hospedeiro o fungo produz antibióticos para competir com bactérias. Assim que a cavidade corporal torna-se repleta com massa fúngica, sob condições favoráveis, há a extrusão das hifas germinadas e formação de conídios esverdeados, os quais fornecem o aspecto mumificado característico (Figura1) (KANZOK & JACOBS-LORENA, 2006).

Na última etapa do ciclo de infecção, após a extrusão do fungo ocorre uma nova conidiação para permitir a propagação dos esporos. O conídio é o propágulo que inicia a patogênese e está envolvido na transmissão da infecção fúngica. A conidiogênese envolve a deposição de material de parede celular (quitina e glicanas), o acúmulo de ácido nucleico e o movimento de material da região subapical até a ponta da hifa (PENG *et al.*, 2009).

Peng *et al.* (2009) detectaram a presença de transcritos preferencialmente expressos na conidiogênese, um dos primeiros estudos a tratar da elucidação da etapa final da infecção. Utilizando a técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS) foi possível detectar transcritos homólogos a: proteína MAPKK-quinase (MAPKKK), formato desidrogenase NAD-dependente (FDH), HSP70, quitina sintase, proteína ligada a GPI, glicosiltransferase ligada a GPI entre outras. Essas proteínas estão envolvidas na conidiogênese em outros fungos. Também foi detectado um aumento dos transcritos do

gene que codifica a protease Pr1A durante os estágios finais da patogênese, quando o fungo emerge do hospedeiro (SMALL & BIDOCHKA, 2005).

O mutante funcional do gene *cag8*, um gene regulador da via de sinalização de proteína G, impediu a conidiação, reduziu o crescimento micelial, provocou a perda de pigmentação, a formação de blastosporos estruturalmente irregulares e a diminuição da virulência frente a *G. mellonella*. Além disso, o mutante também apresentou uma diminuição >200 vezes no nível de transcritos do gene *ssgA*, o qual codifica uma hidrofobina (FANG *et al.*, 2007). *Cag8* é expresso constitutivamente durante a extrusão do micélio fúngico e na conidiação sobre os cadáveres de insetos (FANG & BIDOCHKA, 2006).

Além dos estudos que caracterizaram genes determinantes de virulência através de experimentos de deleção e superexpressão, inúmeros trabalhos que aplicam abordagens globais realizadas em condições de infecção detectam tanto a presença de uma ampla gama de proteínas quanto a expressão diferencial de transcritos diversos.

#### *Deteção de proteínas envolvidas no processo de infecção*

Já foram estudadas as proteínas secretadas por *M. anisopliae* durante infecção em diferentes hospedeiros (XIA *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2006), as proteínas ligadas a parede celular do esporo (BITTENCOURT *et al.*, 2004; SANTI *et al.*, 2010) e também, as proteínas secretadas em meio de cultivo determinados ou que mimetizam condições de infecção (contendo cutícula ou hemolinfa de insetos) (ST. LEGER *et al.*, 1995; de MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; LUBECK *et al.*, 2008).

No trabalho de Santi *et al.* (2009) foram detectadas diversas proteínas da superfície do conídio. Utilizando um método de extração das proteínas ligadas a parede celular e posterior estudo de atividade enzimática foi possível detectar a presença de proteases, quitinases, lipases, uma trealase e enzimas envolvidas na resposta a estresse (SOD e catalase). *M. anisopliae* apresenta três superóxido dismutases e uma delas teve sua localização celular detectada na parede celular (BITTENCOURT *et al.*, 2004).

A maior parte dos trabalhos que tem por objetivo detectar proteínas expressas pelo fungo em meio de cultivo contendo cutícula ou hemolinfa de insetos detectou, de maneira geral, as mesmas proteínas: protease Pr1A, carboxipeptidases, tripsinas, quitinases, lipases,

etc (ST. LEGER *et al.*, 1994, 1995; GILLESPIE *et al.*, 1998; de MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004, da SILVA *et al.*, 2005).

#### *Análise de transcritos com expressão aumentada durante a infecção*

Para a caracterização molecular do processo de infecção abordagens que envolvem o estudo de transcritos em condições e tipos celulares diversos também são importantes. Dutra *et al.* (2004) identificaram ESTs em condições que mimetizam a infecção de *M. anisopliae* por cultivo na presença de carapaça de *R. microplus*. Os mRNAs foram extraídos destes cultivos e comparados com o cultivo em glicose através de uma análise de diferença representacional de transcritos (RDA). Dentre os genes que apresentaram transcritos na condição de infecção sobre carapaça estão: a protease Pr1C, uma exoglicanase, uma gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, uma proteína integral de membrana (PTH11), uma flavohemoglobina, uma transaldolase e outros genes relacionados a proteínas antioxidantes (catalase e HSP70), entre outros. Das treze sequências que, na época, não apresentavam homologia a bancos de dados, aquelas que tiverem maior representatividade entre os clones (números de acesso do NCBI AJ274294, AJ272764 e AJ274081) são correspondentes à adesina MAD1, identificada posteriormente em 2007 (WANG & ST. LEGER). Outros clones (BQ142708, AJ273088 e AJ273718) apresentam similaridade a uma glicosiltransferase Mgw1 (DQ338441) (WANG & ST.LEGER, dados não publicados) e ao gene *Mmc*, que controla o microciclo de conidiação (FJ827120) (LIU & XIA, dados não-publicados).

O isolamento e a classificação de 120 ESTs superexpressas *in vivo* durante a infecção de *M. anisopliae* na hemolinfa de *L. migratoria* foi efetuado (ZHANG & XIA, 2009). Destas, 65% apresentaram baixa similaridade com bancos de dados. Dentre aquelas que apresentaram similaridade à sequências conhecidas estão uma  $\alpha$ -1-2-manosiltransferase, uma glicosiltransferase, uma proteína ativadora de GTPase, uma serinotreonina quinase e uma proteína similar a pisatina demetilase (proteína detoxificante), entre outras. Os autores sugerem que duas das ESTs detectadas, homólogas a manosiltransferase e a glicosiltransferase, podem apresentar papéis importantes nas mudanças morfogênicas associadas ao desenvolvimento do fungo na hemolinfa. Sabe-se que a manosiltransferase atua na glicosilação de proteínas e na síntese da parede celular; e a glicosiltransferase está envolvida na integridade e reorganização da parede celular.

Em uma comparação realizada entre bibliotecas de ESTs de *M. anisopliae* e *M. acridum*, pode ser detectada em ambas a presença marcante de várias depolimerases secretadas, como proteases e quitinases (FREIMOSER *et al.*, 2003). He & Xia (2008) analisaram os transcritos presentes na diferenciação e na germinação de *M. acridum* sobre asas de *L. migratoria*. Os transcritos mais representados foram relacionados ao metabolismo de lipídeos e foi encontrado um homólogo ao gene de uma tetraspanina. A disrupção deste gene em *Magnaporthe grisea* e *Botrytis cinerea* resultou em mutantes não patogênicos, incapazes de penetrar nos tecidos de plantas (CLERGEOT *et al.*, 2001; GOURGUES *et al.*, 2004).

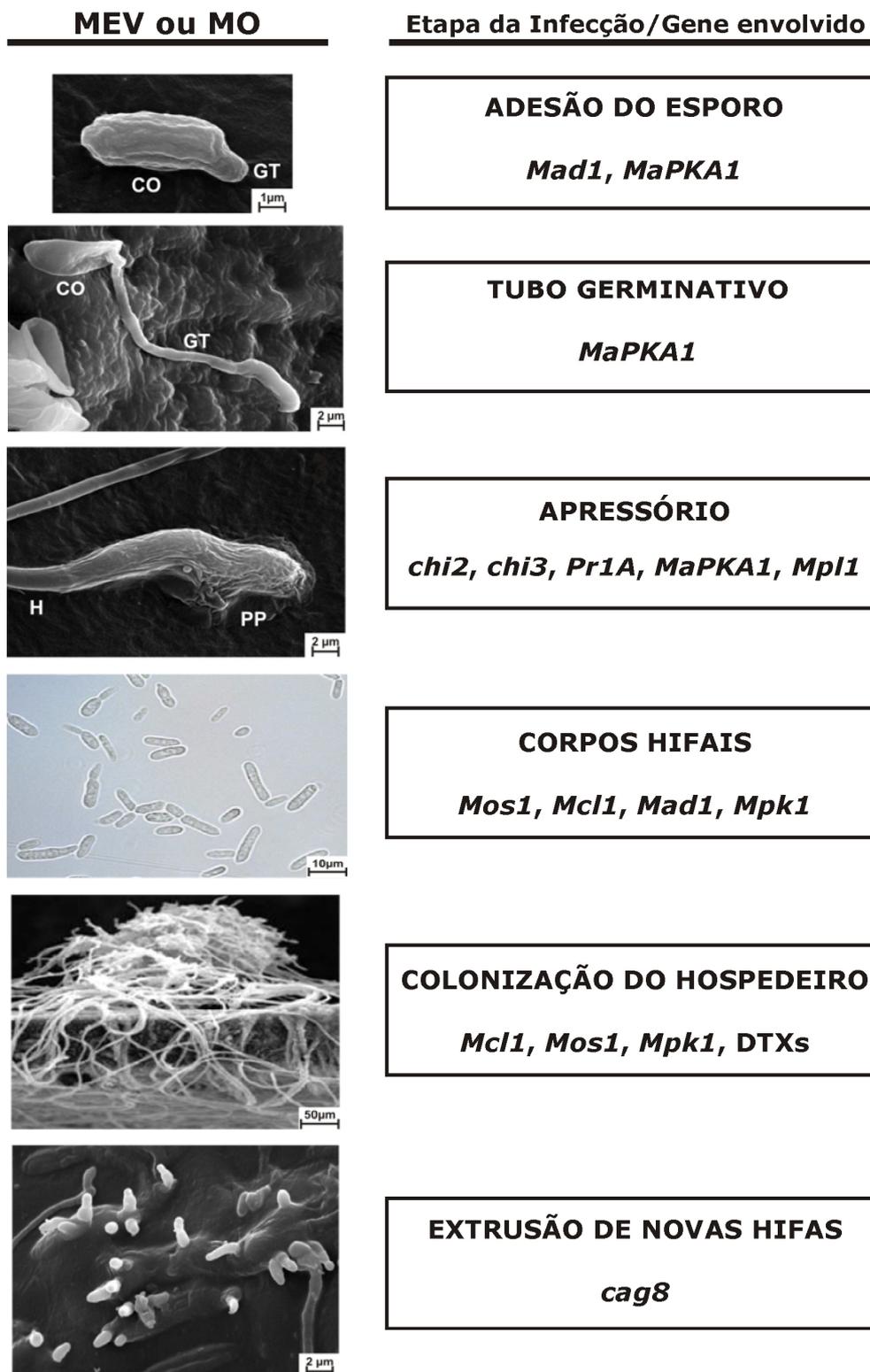
Ainda, foi realizada uma análise de ESTs e microarranjos de três bibliotecas diferentes, onde *M. anisopliae* foi cultivado primeiramente em meio Sabouraud e depois transferido para as condições: exudatos de raízes de planta, cutícula de inseto e hemolinfa de inseto (WANG *et al.*, 2005). Os transcritos mais representativos da condição cutícula foram as proteases, sendo estas quase ausentes da condição hemolinfa. Na hemolinfa, foram detectados genes relacionados a glicoxal oxidase e fosfoacetolase, ao ciclo circadiano, além de produtos envolvidos na detoxificação, na síntese de metabólitos tóxicos e na síntese de proteínas de matriz extracelular. Inúmeros outros genes foram expressos nas três condições diferentes e os autores afirmam que esses resultados sugerem que a habilidade de se adaptar a diferentes ambientes requer a expressão de diferentes grupos de genes. A adaptabilidade fisiológica que resulta de genes diferencialmente expressos envolve diferentes: mecanismos de percepção, propriedades da superfície celular, cadeias de transdução de sinal e respostas fisiológicas finais.

Estes estudos de detecção global de proteínas e transcritos em determinadas condições ou tipos celulares auxiliam enormemente na busca por genes que possam vir a ser determinantes de patogenicidade. Atualmente, com a diversidade de trabalhos publicados que identificam a presença de proteínas e transcritos, ampliam-se as possibilidades para estudar a função dos genes correspondentes através de métodos que esclareçam a sua função específica.

Na Tabela 3 estão listados os genes de *M. anisopliae* cuja participação no processo de infecção já foi determinada por deleção ou superexpressão, e os genes cujos transcritos foram identificados e superexpressos nas condições de infecção.

**Tabela 3. Genes descritos no processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros.**

Gene	Proteína	Efeito após deleção* gênica ou superexpressão**	Diferenças na expressão do transcrito correspondente
<i>Pr1A</i>	Protease tipo-subtilisina	** Aumento da virulência contra larvas de <i>Manduca sexta</i> (ST. LEGER, 1996)	Aumento da expressão dos transcritos nos estágios iniciais e tardios da patogênese e na conidiação (SMALL & BIDOCHKA, 2005; FANG & BIDOCHKA, 2006)
<i>Mcl1</i>	Proteína tipo-colágeno	* Perda da capacidade de escape ao sistema imune de <i>M. sexta</i> e virulência reduzida (WANG & ST. LEGER, 2006)	Aumento da expressão dos transcritos na hemolinfa de 7 diferentes insetos (WANG & ST. LEGER, 2006)
<i>cag8</i>	Regulador da via de sinalização de proteína G	* Ausência de conidiação, redução da produção de blastosporos, da síntese da hidrofobina SsgA e da virulência contra <i>G. mellonella</i> (FANG <i>et al.</i> , 2007)	Aumento da expressão dos transcritos nos estágios tardios da conidiogênese sobre os cadáveres de insetos (FANG & BIDOCHKA, 2006)
<i>Mad1</i>	Adesina	* bloqueio da adesão, atraso na germinação, supressão da formação de blastosporos e virulência reduzida contra <i>M. sexta</i> (WANG & ST. LEGER, 2007a)	Aumento da expressão dos transcritos na hemolinfa e em meio rico em nutrientes (WANG & ST. LEGER, 2007a) e um dos transcritos mais representativos em condições de infecção (DUTRA <i>et al.</i> , 2004)
<i>Mos1</i>	Osmosensor	Supressão por silenciamento gênico (RNAi) resultou em alterações na diferenciação do apressório e dos blastosporos, na biossíntese da parede celular e virulência reduzida contra <i>M. sexta</i> (WANG <i>et al.</i> , 2007)	Aumento da expressão dos transcritos na hemolinfa e em cultivos com condições artificiais de alta osmolaridade (WANG <i>et al.</i> , 2007)
<i>MaPKA1</i>	Subunidade catalítica 1 da proteína quinase A	*Desenvolvimento reduzido, atraso na diferenciação, apressórios defeituosos e virulência reduzida contra <i>G. mellonella</i> (FANG <i>et al.</i> , 2009)	Expressão constitutiva (FANG <i>et al.</i> , 2009)
<i>chi2</i>	Endoquitinase	*mutante apresenta virulência reduzida e **superexpressão apresenta virulência aumentada, ambos contra <i>D. peruvianus</i> (BOLDO <i>et al.</i> , 2009)	Aumento da expressão dos transcritos em cultivos contendo quitina 1% (BOLDO <i>et al.</i> , 2009)
<i>chi3</i>	Endo-exo-quitinase	* virulência reduzida contra <i>D. peruvianus</i> (STAATS, 2007)	Aumento da expressão dos transcritos após choque térmico (STAATS, 2007)
<i>Mpk1</i>	Fosfocetolase	*Virulência reduzida contra larvas de <i>M. sexta</i> (DUAN <i>et al.</i> , 2009)	Aumento da expressão dos transcritos na hemolinfa (DUAN <i>et al.</i> , 2009)
<i>Mpl1</i>	Perilipina	* diminuição da formação de vesículas lipídicas, da pressão de turgor de apressórios e virulência reduzida contra larvas de <i>M. sexta</i> (WANG & ST. LEGER, 2007b)	Aumento da expressão dos transcritos na hemolinfa e em meio rico (WANG & ST. LEGER, 2007b)



**Figura 2.** Etapas da infecção de *M. anisopliae*. Genes e proteínas previamente caracterizados que participam de etapas do mecanismo de infecção estão citados. CO, conídio; GT, tubo germinativo; H, hifa e PP, grampo de penetração. Imagens de microscopia ótica e eletrônica de varredura de ARRUDA *et al.* (2005) e SCHRANK.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho pretende contribuir no conhecimento do mecanismo de infecção de *M. anisopliae*, pelo desenvolvimento de duas abordagens relacionadas. É proposta a construção de uma linhagem de *M. anisopliae*, expressando o peptídeo tóxico inseticida Jaburetox-2Ec, oriundo da leguminosa *Canavalia ensiformis*. Esta construção pretende que a expressão do peptídeo ocorra na hemolinfa dos hospedeiros e testará a influência da proteína tóxica na velocidade de morte de hospedeiros. Uma outra etapa deste trabalho objetiva descrever o conteúdo de quitinases putativas presentes no genoma deste entomopatógeno, utilizando análise *in silico*. A capacidade de infecção *M. anisopliae* está relacionada com o sistema quitinolítico deste organismo. A determinação do número de quitinases que pode estar presente neste organismo e o estudo detalhado da função destas proteínas representam uma perspectiva de contribuição importante para a melhor compreensão do processo de infecção e consequente melhoramento de linhagens deste fungo. O biocontrole mais eficiente poderá resultar da superexpressão de enzimas hidrolíticas, como as quitinases, que são fundamentais na penetração através do hospedeiro e da superexpressão de toxinas inseticidas na hemolinfa. Essa metodologia reduziria drasticamente o tempo necessário para matar o hospedeiro através da potencialização de dois fatores que atuam em diferentes etapas da infecção.

A presente dissertação está apresentada em dois capítulos:

**CAPÍTULO 1** – Expressão do Peptídeo Tóxico Jaburetox-2Ec de *Canavalia ensiformis* no Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

e

**CAPÍTULO 2** – Avaliação em Escala Genômica das Quitinases de *Metarhizium anisopliae*.

### 3. CAPÍTULO 1

Expressão do Peptídeo Tóxico Jaburetox-2Ec de *Canavalia ensiformis* no Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

#### 3.1. INTRODUÇÃO

##### 3.1.1 - Potencialização do Biocontrole por Entomopatógenos

Formulações das linhagens selvagens de entomopatógenos apresentam alguns fatores limitantes que atrasam a ampliação das aplicações e os investimentos no controle biológico. A manipulação genética pode ser utilizada para o desenvolvimento de linhagens mais eficazes (MEYER, 2008; ST. LEGER & WANG, 2009). Cada uma das etapas da infecção pode ser potencializada por diferentes metodologias. Algumas das características fúngicas que podem ser modificadas incluem a restrição ou ampliação do espectro de hospedeiros suscetíveis, a redução da carga de inóculo necessária para ter efeito sobre a população de pragas e a alteração da competência saprofítica da linhagem. No entanto, o principal fator limitante é o lapso de tempo decorrido entre a adesão do esporo na cutícula do hospedeiro e a efetiva morte deste.

Este objetivo pode ser alcançado através da superexpressão de genes que são determinantes da virulência do entomopatógeno. A transformação de fungos filamentosos mediada pelo sistema de *Agrobacterium tumefaciens* é um método bem estabelecido e bem sucedido (DE GROOT, 1998; FANG *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2007; STAATS *et al.*, 2007). Essa metodologia possibilita a inserção de *cassettes* estáveis para a superexpressão de genes no genoma de fungos.

As etapas da infecção mais bem descritas são a etapa inicial de adesão dos esporos, germinação e formação do apressório e a etapa de colonização na hemolinfa do hospedeiro na forma de corpos hifais. Os genes que estão envolvidos nestas etapas da infecção podem ser manipulados para promover uma morte mais rápida do hospedeiro. A utilização de diferentes promotores para controlar a regulação destes genes também acrescenta possibilidades. Por exemplo, Wang & St. Leger (2007) utilizaram o promotor do gene

*Mcl1* (que é capaz de produzir altos níveis de transcritos deste gene na hemolinfa dos insetos) nas suas construções. Neste caso, a expressão do gene de interesse é regulada temporalmente de acordo com as etapas da infecção. Além disso, esta construção é uma opção de linhagem biocontroladora mais “segura”, pois restringe a expressão do gene de escolha a um determinado “ambiente” específico dos insetos, impedindo sua expressão quando presente no solo na forma saprofítica.

Um promotor que apresenta potencial para construção de linhagens melhoradas é aquele responsável pela expressão da trealase ácida de *M. anisopliae*. A trealose é o principal açúcar presente na hemolinfa dos insetos e é capaz de induzir a ativação deste promotor (ZHAO *et al.*, 2006). Outra opção é a utilização de promotores fortes que garantam a expressão em grandes quantidades de proteínas de interesse como quitinases, proteases e toxinas inseticidas (NAKAZATO *et al.*, 2005).

A inserção de cópias extras (de 3 a 6) do gene que codifica a protease Pr1A sob regulação de um promotor constitutivo foi realizada em *M. anisopliae* e pode-se observar uma redução de 25% no tempo necessário para matar as larvas de *M. sexta* em comparação com o tipo selvagem. Além disso, houve uma diminuição de 40% do consumo de alimento pelo hospedeiro e consequente perda de peso (St. LEGER *et al.* 1996).

Outro dado importante gerado neste trabalho foi a observação de que insetos mortos pela linhagem transgênica apresentam extensiva melanização, o que os torna substratos pobres para o crescimento e extrusão fúngicos. Os cadáveres melanizados suportam pouca esporulação, o que causa uma redução da persistência da linhagem modificada no ambiente e, portanto, uma contenção biológica natural. Além disso, este fator torna o fungo recombinante mais permissivo a realização de testes em campo para futura aplicação comercial.

As primeiras etapas de infecção de *M. anisopliae* ocorrem num período de 24 - 48 horas (ARRUDA *et al.*, 2005). No entanto, o tempo médio de morte dos organismos hospedeiros é de cinco a dez dias (ST. LEGER *et al.*, 1996; FRAZZON *et al.*, 2000), e em parte deste período o fungo está se desenvolvendo na hemolinfa do inseto. Esta etapa parece ser a mais demorada, por isso, a expressão de uma toxina que acelere esta etapa em especial pode determinar uma diminuição significativa no tempo necessário para matar o hospedeiro, período este em que o inseto continua se alimentando e, portanto, causando prejuízo às lavouras.

A utilização de um peptídeo com alta toxicidade a insetos para potencializar a ação de *M. anisopliae* contra seus hospedeiros foi realizada pela expressão da toxina do escorpião *Androctonus australis* (WANG & ST. LEGER, 2007b). A expressão da neurotoxina AaIT (70 aminoácidos) foi regulada pelo promotor do gene *Mcl1*, apresentando altos níveis e expressão na hemolinfa. Houve um aumento de 22 vezes na toxicidade fúngica desta linhagem contra larvas de *M. sexta* e de nove vezes contra mosquitos adultos de *A. aegypti*. A linhagem selvagem necessitou de  $1,8 \times 10^7$  esporos/mL para atingir 50% de mortalidade (LC<sub>50</sub>) das larvas, enquanto  $8,1 \times 10^5$  esporos/mL foram necessários para alcançar a mesma mortalidade com a linhagem expressando AaIT. Em uma concentração de esporos alta o suficiente para o tipo selvagem matar a maioria dos insetos, a linhagem-AaIT reduziu a sobrevivência de *M. sexta* e *A. aegypti* em 28% e 38%, respectivamente.

Pava-Ripoll *et al.* (2008) utilizaram esta mesma linhagem expressando a neurotoxina de escorpião contra a broca-do-café *Hypothenemus hampei*. Neste estudo, outros parâmetros importantes foram avaliados, como alterações na taxa de germinação do fungo, mudanças morfológicas nos tubos germinativos e efeitos da concentração de esporos utilizada. Em concentrações  $> 10^4$  esporos/mL, tanto o tipo selvagem quanto a linhagem AaIT apresentaram  $> 96\%$  de mortalidade contra *H. hampei*. No entanto, ao reduzir a concentração de esporos, a linhagem transgênica aumentou significativamente a mortalidade em 32,2% (para  $10^1$  esporos/mL), 56,6% (para  $10^2$  esporos/mL) e 24,6% (para  $10^3$  esporos/mL), sendo que a mortalidade iniciou de 1 a 3 dias mais cedo em comparação a selvagem.

Para o desenvolvimento de uma linhagem biocontroladora ideal talvez seja necessária à manipulação de diversos genes que codifiquem enzimas e toxinas com atuação aditiva e sinérgica. As dificuldades que precisam ser resolvidas para a plena utilização de entomopatógenos incluem, além dos aspectos científicos, os aspectos sociais, econômicos e políticos (SHAH & PELL, 2003).

### 3.1.2 - Peptídeo Entomotóxico Jaburetox-2Ec

Jaburetox-2Ec (de *Jack bean urease toxin*) é um peptídeo entomotóxico derivado de uma isoforma de urease (JBURE-II) de *C. ensiformis*, leguminosa conhecida pelo nome popular de feijão-de-porco. Devido a uma similaridade entre as sequências nucleotídicas de Jaburetox-2Ec e do peptídeo tóxico pepcanatox previamente estudado (MULINARI *et al.*, 2007), o peptídeo Jaburetox-2Ec foi isolado e expresso em *E. coli* para posterior estudo.

O peptídeo pepcanatox (de 10 kDa) corresponde a uma porção da canatoxina, uma proteína tóxica caracterizada como uma isoforma minoritária da urease de *C. ensiformis* (FOLLMER *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que a atividade entomotóxica da canatoxina é independente da sua atividade ureolítica (FOLLMER *et al.*, 2004) e requer o processamento proteolítico prévio da mesma por enzimas digestivas dos insetos (CARLINI *et al.*, 1997). Esta atividade entomotóxica da canatoxina está presente no peptídeo pepcanatox, o qual pode ser produzido *in vitro* pela hidrólise da urease com enzimas digestivas do tipo catepsinas obtidas de insetos suscetíveis (FERREIRA DA SILVA *et al.*, 2000).

Baseados na sequência de pepcanatox, Mulinari *et al.* (2007) desenharam *primers* para obtenção do peptídeo Jaburetox-2Ec a partir do cDNA do gene JBURE-II, isolado anteriormente (PIRES-ALVES *et al.*, 2003). O *amplicon* obtido e que apresenta similaridade a pepcanatox foi chamado de Jaburetox-2. Posteriormente, esse peptídeo recombinante (13 kDa) foi expresso em *E. coli*, sendo chamado então de Jaburetox-2Ec, e purificado (MULINARI *et al.*, 2004 - patente).

Através de bioensaios utilizando o peptídeo purificado, foi demonstrada a atividade tóxica sobre o percevejo manchador do algodão, *D. peruvianus*. O efeito letal de Jaburetox-2Ec com 100% de mortalidade aos insetos foi atingido após onze dias (MULINARI *et al.* 2007). Os insetos foram alimentados com sementes artificiais de algodão contendo 0,01% (w/w) de Jaburetox-2Ec. Após a ingestão do peptídeo, os insetos apresentaram paralisia momentânea e movimentos desordenados das antenas precedendo morte, sugerindo que a toxina possa estar levando a morte por afetar a permeabilidade das membranas. Camundongos alimentados com a toxina ou injetados com doses de 10 mg/Kg de Jaburetox-2Ec não apresentaram sinais de toxicidade.

Na tentativa de entender o mecanismo de ação desta toxina, Mulinari *et al.* (2007) realizaram experimentos de modelagem molecular para relacionar a estrutura tridimensional do peptídeo com a sua atividade tóxica. Os resultados predizem que a estrutura de Jaburetox-2Ec possa formar um grampo-beta ( $\beta$ -*hairpin*), motivo comumente encontrado em uma classe de peptídeos formadores de poros (BROGDEN, 2005) e em um tipo de neurotoxina (MENEZ, 1998). Desta maneira, acredita-se que Jaburetox-2Ec possa estar atuando na inibição de canais iônicos ou ter atividade de formação de poros de membranas.

Em 2009, Stanisçuaski *et al.* detectaram que Jaburetox-2Ec afeta a secreção de fluidos dos túbulos de Malpighi isolados de *Rhodnius prolixus*. Em ensaios de indução da diurese causados por serotonina, Jaburetox-2Ec é capaz de inibir esta indução em concentrações tão pequenas quanto  $10^{-16}$  e  $10^{-15}$  M. No trabalho de Barros *et al.* (2009), foi elucidada uma função mais específica para a atividade de Jaburetox-2Ec. Jaburetox-2Ec é capaz de se ligar a fosfolipídios acídicos de membranas e induzir o completo vazamento de uma solução de carboxifluoresceína adicionada dentro de vesículas unilamelares. A superfície carregada das membranas parece influenciar a interação de Jaburetox-2Ec com as membranas. Os autores sugerem que Jaburetox-2Ec atue promovendo a permeabilização de membranas.

Em um alinhamento realizado por Mulinari *et al.* (2007), a comparação entre a sequência de Jaburetox-2Ec com as sequências correspondentes em outras ureases apresentou identidade entre 53 e 73% (urease de *Oriza sativa* e a isoforma majoritária JBURE-I de *C. ensiformis*, respectivamente). As sequências peptídicas de pepcanatox e de Jaburetox-2Ec (que corresponde aos aminoácidos 169 a 260 da urease JBURE-II) localizam-se entre os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  das ureases de plantas, os quais estão ausentes em ureases bacterianas. Acredita-se que as ureases de plantas sejam pró-toxinas por conter sequências equivalentes às de pepcanatox ou Jaburetox-2Ec, estando relacionadas com os mecanismos de defesas das plantas contra os insetos e, portanto, apresentam alto potencial para serem utilizadas como toxinas bioinseticidas no controle de pestes da agricultura.

A atividade tóxica de Jaburetox-2Ec sobre os artrópodes *D. peruvianus*, *Spodoptera frugiperda*, *Triatoma infestans*, *R. prolixus* e *Blatella germanica* (MULINARI *et al.*, 2007; TOMAZETTO *et al.*, 2007; STANISÇUASKI *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2009) demonstra que este é um peptídeo com alto potencial para expressão no entomopatógeno

*M. anisopliae* com o objetivo de desenvolver novos bioinseticidas. Desta maneira, neste estudo, foi realizada a clonagem desta toxina oriunda da leguminosa *C. ensiformis* e construção de vetores para transformação de *M. anisopliae*.

## 3.2. OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo a construção de vetores para o desenvolvimento de uma linhagem de *M. anisopliae* expressando o peptídeo tóxico Jaburetox-2Ec e posterior avaliação da expressão desta toxina inseticida.

## 3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.3.1. Material Biológico:

A linhagem *M. anisopliae* var. *anisopliae* E6 utilizada neste trabalho foi originalmente isolada de *Deois flavopicta* (Homoptera:Cercopidea) no estado do Espírito Santo, Brasil, cedida pelo Prof. João Lúcio de Azevedo da coleção da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

Células de *E. coli*, linhagem BL21 (DE3) Star transformadas com o vetor de expressão pET101/D-TOPO contendo o fragmento correspondente ao peptídeo Jaburetox-2Ec foram cedidas pelo Laboratório de Proteínas Tóxicas (Centro de Biotecnologia UFRGS). As linhagens Stbl4 e TG2 de *E. coli* foram preparadas para eletrocompetência e utilizadas nas eletroporações como hospedeiras de vetores pUC18, pTEF/tTrpC e plasmídeos derivados destes.

A linhagem e o vetor binário de *A. tumefaciens* utilizados em nosso protocolo de agrotransformação são EHA105 e pPZP201BK, respectivamente. As células EHA105 foram preparadas para quimiocompetência.

### 3.3.2. Meios de Cultivo e Manutenção dos Organismos

#### *Meios de Cultivo e Manipulação para M. anisopliae*

Os meios de cultivo utilizados para a manutenção e repiques de *M. anisopliae* foram: Meio de Cove (MC) [glicose 1%, nitrato de sódio 0,6%, pH 7,0] e Meio de Cove Completo (MCc) [glicose 1%, nitrato de sódio 0,6%, casaminoácidos 0,15%, extrato de levedura 0,05%, peptona 0,2%, pH 7,0]. São ainda acrescidos: 2% de Solução de Sais [KCl 2,6%, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 2,6% e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,6%(p/v)] e 0,04% de Solução de Elementos Traços [Na<sub>2</sub>Ba<sub>4</sub>O<sub>7</sub>•7H<sub>2</sub>O 4 mg%, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 40 mg%, FeSO<sub>4</sub> 1 mg%, Na<sub>2</sub>MNO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 80 mg%, MnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 80 mg% e ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 80 mg% (p/v)]. Para meios sólidos foi acrescido 1,5% de ágar. As suspensões de esporos do fungo foram efetuadas utilizando-se 3 mL de Tween 80% estéril para cada placa de Petri contendo *M. anisopliae* esporulado em MCc; centrifugações e lavagens com água destilada estéril; ressuspensão dos esporos em 1 mL e contagem da diluição dos mesmos em camara de Neubauer.

#### *Meios de Cultivo e Manipulação para E. coli*

Inóculos de células de *E. coli* foram efetuados em Meio Luria-Bertani (LB) [triptona 1%, extrato de levedura 5%, NaCl 1% (p/v), pH 7,0] e em Meio SOC [triptona 1%, extrato de levedura 5%, NaCl 1% e glicose 20mM] após eletroporação. Aos meios sólidos foram adicionados 1,5% de ágar. Todos foram mantidos a 37°C.

### 3.3.3. Manipulação de Ácidos Nucléicos

A extração de DNA fúngico a partir de micélio foi realizada conforme protocolo estabelecido por Nakazato *et al.* (2005). Para realizar a extração de DNA de esporos em forno de microondas, uma alçada de esporos foi retirada de placas esporuladas de *M. anisopliae* e adicionada em tubos Eppendorf contendo 100 µl de água milliQ. Após permanecer por 10 minutos no forno de microondas em potência máxima, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante removido para tubos novos. Após nova centrifugação, 5 µl do sobrenadante foram utilizados como molde para a reação de PCR. Esta metodologia teve como base a descrita por Ferreira & Glass (1996). A extração de DNA plasmidial a partir de *E. coli* por lise alcalina foi realizada conforme Sambrook & Russell (2001).

### 3.3.4. Soluções e Enzimas Utilizadas

As soluções e tampões foram preparados de acordo com Sambrook & Russell (2001), utilizando água destilada ou MilliQ autoclavadas. As enzimas de restrição e de modificação foram obtidas a partir de CenBiot Enzimas, *Fermentas*, *Invitrogen* e *New England Biolabs*.

### 3.3.5. Construção de pPZP::JAB::BAR para Agrotransformação

Os oligonucleotídeos utilizados para a obtenção da sequência referente ao peptídeo Jaburetox-2Ec foram elaborados contendo sítios de clivagem para as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI* (JabF – 5'GGTACCATGGGTCCAGTTAATGAAGCC3' e JabR – 5'GGATCCTCAACCGGTACGCGTAGAATC3'). A região codificante do peptídeo Jaburetox-2Ec com adição de um códon ATG (279 pb) e a sequência referente ao epítipo V5 fusionada à Jaburetox-2ec foram amplificadas por PCR, tendo como molde o plasmídeo pET101/D-TOPO/JBURE-II (MULINARI *et al.*, 2007). O epítipo V-5 constitui-se de 14 aminoácidos (GKPIPPLLGLDST) derivados das proteínas P e V do paramyxovirus SV5 (*Simian virus 5*) (SOUTHERN *et al.*, 1991) e está presente no vetor pET101 para permitir a fusão a proteínas expressas e detecção por anticorpo anti-V-5. No estudo de Mulinari *et al.* (2007) foi determinado que o acréscimo da sequência V-5 não alterou a característica tóxica de Jaburetox-2Ec. O fragmento amplificado por PCR (372 pb) foi purificado a partir de gel de agarose com o kit para purificação de ácidos nucleicos GFX (GE), em seguida tratado com as enzimas Klenow e T4 PNK, e clonado no vetor pUC18 para proceder ao sequenciamento do inserto. Após a confirmação da sequência, o plasmídeo pUC18::JAB foi clivado com as enzimas *KpnI* e *BamHI* para liberação da banda correspondente ao peptídeo e posterior subclonagem em pTEF/tTrpC. Este plasmídeo contém o promotor do gene *tef-1- $\alpha$*  (*translation elongation factor 1- $\alpha$* ) de *M. anisopliae* e o terminador do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (NAKAZATO, *et al.* 2005). O *cassette* para expressão de Jaburetox-2Ec (1.774 pb) contém, então, a região promotora do gene *tef-1- $\alpha$*  e a região terminadora do gene *trpC*. Esta ligação foi transformada em células de *E. coli* Stbl4 por eletroporação e, após a obtenção do plasmídeo pTEF::JAB::tTrpC, este foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *PstI* para permitir posterior subclonagem em pPZP201BK.

Após subclonagem da região referente ao *cassette* de expressão de Jaburetox-2Ec no vetor binário pPZP201BK, este foi clivado com a enzima *PstI* para permitir a inserção do *cassette* de expressão do gene *bar* (3,5 Kb). Este gene codifica uma fosfotricina acetiltransferase (THOMPSON *et al.*, 1987) que confere resistência ao antibiótico glifosinato de amônio e permite, portanto, a seleção de transformantes de *M. anisopliae* em meio contendo este antibiótico (250 µg/mL). O vetor construído, chamado de pPZP::JAB::BAR, foi então transformado por choque térmico em células de *A. tumefaciens*.

### 3.3.6. Agrotransformação de *M. anisopliae* e Confirmação da Inserção dos Cassettes

As células de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor pPZP::JAB::BAR foram utilizadas para agrotransformação de *M. anisopliae* conforme protocolo previamente estabelecido (STAATS *et al.*, 2007). Brevemente, a linhagem de *A. tumefaciens* portando o vetor binário recombinante foi co-cultivada com *M. anisopliae* para permitir a transferência do material inserido entre as bordas esquerda e direita do vetor. É utilizada acetoseringona para permitir a indução dos genes de virulência da bactéria. As linhagens transformantes se caracterizam pela inserção dos *cassettes* de expressão: do peptídeo tóxico Jaburetox-2Ec e do gene de resistência a glifosinato de amônio. A inserção ocorre geralmente em cópia única em regiões aleatórias do DNA do fungo.

Para confirmar a inserção dos *cassettes* nos transformantes gerados, foi realizada extração de DNA de esporos em forno de microondas seguido de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam (1) 372 pb referentes a Jaburetox-2Ec, (2) 566 pb referentes ao gene *bar* e (3) 3.854 pb referentes a um fragmento que contém regiões dos dois *cassettes*. A reação 1 utiliza os oligonucleotídeos JabF e JabR, a reação 2 utiliza os oligonucleotídeos BarF (5' – CCATGGCCATGAGCCCAGAACGAC-3') e BarR (5' – GGATCCTCAGATCTCGGTGACGGG-3') e a reação 3 utiliza JabF e BarR. Os transformantes que apresentaram sinal de amplificação positivo neste primeiro *screening* foram cultivados para realizar extração de DNA micelial. Após extração, foi realizada nova reação de PCR para amplificação das mesmas regiões previamente descritas a partir do DNA micelial de quatro dos transformantes e da linhagem selvagem.

### 3.3.7. Análise da Expressão de *Jaburetox-2Ec* por *M. anisopliae*

As linhagens transformantes e a selvagem foram cultivadas em meio líquido e foram extraídas proteínas da fração intracelular por maceração do micélio em nitrogênio líquido e posterior solubilização em tampão [Tris 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5]. Após centrifugação, o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. Cada 1 mL foi liofilizado e ressuscitado em 200 µl. As amostras (~30 µg de cada) foram fervidas por 3 minutos juntamente com Tampão de Amostra [Tris-HCl 31,25 mM, glicerol 10%, SDS 1%, β-mercaptoetanol 100 mM, azul de bromofenol 0,005%] antes de aplicadas em gel de poliacrilamida. As amostras em duplicatas foram submetidas a SDS-PAGE 15% em Tampão de Corrida [Tris base 25 mM, glicina 192 mM, 0,1% SDS]. Um dos géis foi corado com Coomassie Coloidal [Coomassie G250 0,08%, ácido ortofosfórico 16%, sulfato de amônio 8% e metanol 20%] e outro foi utilizado para realizar a transferência das proteínas para membrana de hibridização Hybond-P (GE). A transferência foi realizada em cubas Mini-Protean Cell (BioRad) em Tampão de Transferência [Tris 25 mM, Glicina 192 mM], durante 1 h, 350 mA. A membrana foi lavada em PBS 1X e bloqueada *overnight* a 4°C em Tampão de Bloqueio [leite desnatado em pó 5%, Tween 20 0,1% e PBS 1X]. A confirmação dos transformantes foi avaliada pela presença do sinal de reconhecimento do anticorpo anti-Jaburetox (1:7.500) através da utilização do kit ECL (GE). O anticorpo secundário foi utilizado na concentração de 1:20.000.

### 3.3.8. Isolamento do Promotor e do Peptídeo Sinal contidos no Gene da Trealase Ácida de *M. anisopliae*

Foi realizado, através da técnica de *Genome Walking* (SIEBERT *et al.*, 1995), o isolamento da região promotora e do peptídeo sinal presentes no gene da trealase ácida de *M. anisopliae*. Para tal, foram desenhados oligonucleotídeos utilizando como base a sequência nucleotídica do gene da trealase ácida de *M. acridum* previamente isolado (ZHAO *et al.*, 2006). DNA extraído de *M. anisopliae* foi digerido com as enzimas de restrição *SmaI*, *PvuII*, *StuI*, *RsaI*, *HincII* e *EcoRV* (formadoras de extremidades cegas) e ligado com adaptadores *GenomeWalker* gerando seis bibliotecas para realização do PCR. Cada biblioteca (fragmentos de DNA ligados aos adaptadores) foi utilizada como molde para a reação primária de PCR. Os ciclos utilizados para a amplificações foram: 94°C por 5

minutos, 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 68°C por 3 minutos) e um ciclo final de 68°C por 5 minutos. Um dos oligonucleotídeos da reação primária (GWP1–*GenomeWalking Primer 1*) anela em uma das extremidades contendo o adaptador e o outro oligonucleotídeo é gene específico (TreR1 – 5’CGTGACTGATAACGGCCTTGC3’ ou TreF1 – 5’GGGACACTATCGACGACCAAG3’). A reação primária de PCR foi diluída 50X e então utilizado 1 µl como molde para a reação secundária. Na reação secundária são utilizados oligonucleotídeos *nested*, que anelam em regiões mais internas em relação ao primeiro par de oligonucleotídeos (GWP2 – *GenomeWalking Primer 2*, TreF2 – 5’ACCAACTTGGCTGGATATCCA3’ e TreR2 – 5’AGGAGCCAGTTCTCGTCATCC3’). Foi utilizada a polimerase de alta fidelidade Taq Hi-Fi (Invitrogen) nas reações antecedentes à clonagem dos fragmentos. As bandas correspondentes a amplificações foram recortadas do gel, purificadas, clonadas em pUC18 e sequenciadas. As sequências foram analisadas no pacote de ferramentas Staden (STADEN, 1996; <http://staden.sourceforge.net/>).

### 3.3.9. Análise Bioinformática da Trealase Ácida

A região isolada correspondente a um fragmento do gene da trealase ácida foi analisada *in silico* juntamente com a sequência completa do gene. Como o genoma de *M. anisopliae* E6 estava em fase de sequenciamento, após isolamento da região por *GenomeWalking*, a mesma foi utilizada para realizar uma busca (utilizando a ferramenta tBLASTn no software BioEdit) pela sequência completa do gene nos *contigs* do rascunho genômico até então disponível (HALL, 1999). A sequência resultante desta busca foi utilizada para realizar as predições bioinformáticas. O site de início da tradução, as regiões 5’ e 3’UTR, os éxons e os íntrons da trealase ácida foram preditos pelos softwares FGENESH 2.6 (SALAMOV & SOLOVYEV, 2000; <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) e Augustus 2.1. (STANKE *et al.*, 2004; <http://augustus.gobics.de/>). Os domínios da proteína predita foram analisados pela ferramenta InterProScan (ZDOBNOV & APWEILER, 2001; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) e a presença de possível peptídeo sinal pelo software SignalP 3.0 (EMANUELSSON *et al.*, 2007; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A análise da região promotora foi realizada utilizando-se as ferramentas para busca de sítios de ligação a fatores de transcrição

AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2>), NSITE (SHAHMURADOV & SOLOVYEV; <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), TESS - *Transcription Element Search System* (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) e JASPAR Database - *JASPAR Core Fungi* (SANDELIN *et al.*, 2004; <http://jaspar.genereg.net/>). Um sítio de início da transcrição (SIT) eucariótico diferente do anterior (predito pelo FGENESH) foi predito utilizando a ferramenta Neural Network Promoter Prediction (REESE & EECKMAN, 1995; [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)), disponível no site do Projeto Genoma de *Drosophila* (<http://www.fruitfly.org/index.html>).

### 3.3.10. Construção de Vetores para Estudos de Regulação pelo Promotor da Trealase Ácida

O promotor e o peptídeo sinal presentes no gene da trealase ácida (PTreaPS) foram amplificados com os oligonucleotídeos (TreaFor – 5'GAATCCTCGGCCATACCGAGAGCTGC'3 e TreaRev – 5'GGTACCGGCGGGCTGGACGGC3') contendo os sítios adequados (*EcoRI* e *KpnI* sublinhados, respectivamente) para promover a construção de vetores para analisar sua regulação na presença de trealose. Primeiramente, 1.677 pb referentes a PTreaPS foram clonados em pUC18 e confirmados após sequenciamento. A seguir o plasmídeo pTEF::tTrpC foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *KpnI* para permitir a substituição do promotor do gene *tef-1- $\alpha$*  pelo promotor da trealase, constituindo o vetor pTreaPS::tTrpC.

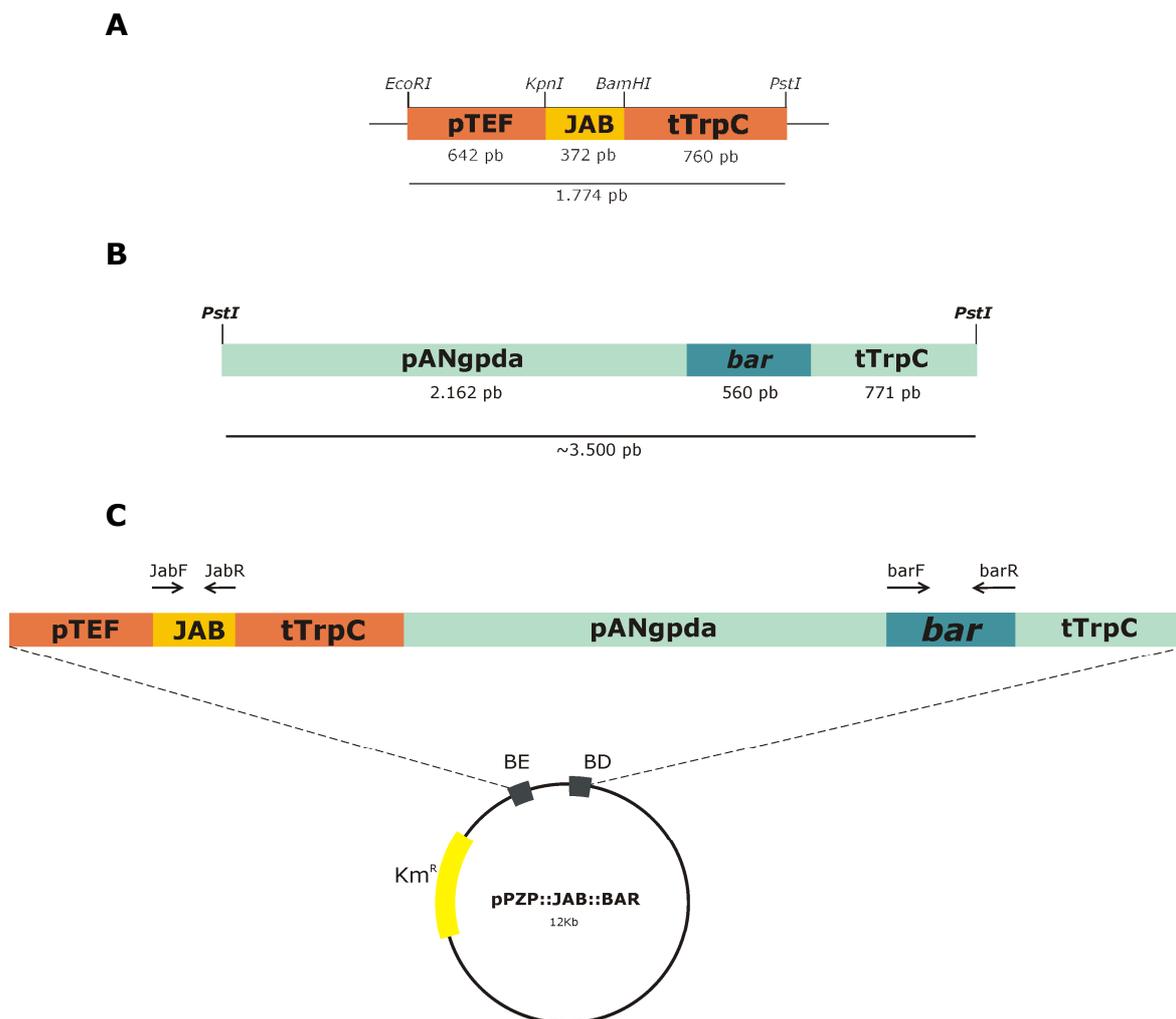
### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1. Construção do Vetor Expressando a Proteína Entomotóxica Jaburetox-2Ec

O *cassette* para a expressão constitutiva do peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec foi construído de maneira que a região codificante de Jaburetox-2Ec (372 pb) fosse controlada pelos elementos reguladores: região promotora pTEF (642 pb) e a região terminadora tTrpC (760 pb), o que pode ser observado na representação esquemática na Figura 3. O promotor do gene *tef-1-a* é considerado um promotor forte e permite a expressão de proteínas recombinantes em quantidades detectáveis (NAKAZATO *et al.*, 2006). No entanto, como primeira alternativa a expressão de Jaburetox-2Ec em *M. anisopliae*, esta construção não apresenta peptídeo sinal e assume-se que o peptídeo recombinante, quando expresso, estará presente na fração intracelular do fungo. Em experimentos anteriores, já foi demonstrado que Jaburetox-2Ec não apresenta ação tóxica contra *M. anisopliae* quando adicionado a meios de cultivo do fungo. A possibilidade da expressão constitutiva de Jaburetox-2Ec em grandes quantidades indica a ausência de toxicidade deste peptídeo também quando expresso de maneira intracelular.

Em alternativa a esta construção, a região promotora e o peptídeo sinal contidos no gene da trealase ácida de *M. anisopliae* foram isolados e serão estudados para permitir a secreção do peptídeo tóxico. De maneira similar, Wang & St. Leger (2007) expressaram uma toxina de escorpião sob regulação do promotor do gene *Mcl1*. Este gene é expresso quando em contato com a hemolinfa de sete diferentes insetos testados, e não em meio rico em nutrientes ou durante condições de privação (WANG & ST. LEGER, 2006). Essa construção permitiu que a expressão da toxina fosse secretada na hemolinfa do inseto e estivesse presente em grandes quantidades.

Como também pode ser observado na Figura 3, o *cassette* para expressão da marca de resistência foi adicionado para permitir a seleção das linhagens recombinantes de *M. anisopliae* após experimento de agrotransformação em meio de cultivo contendo glifosinato de amônio.



**Figura 3. Representação esquemática da construção do plasmídeo pPZP::JAB::BAR.**

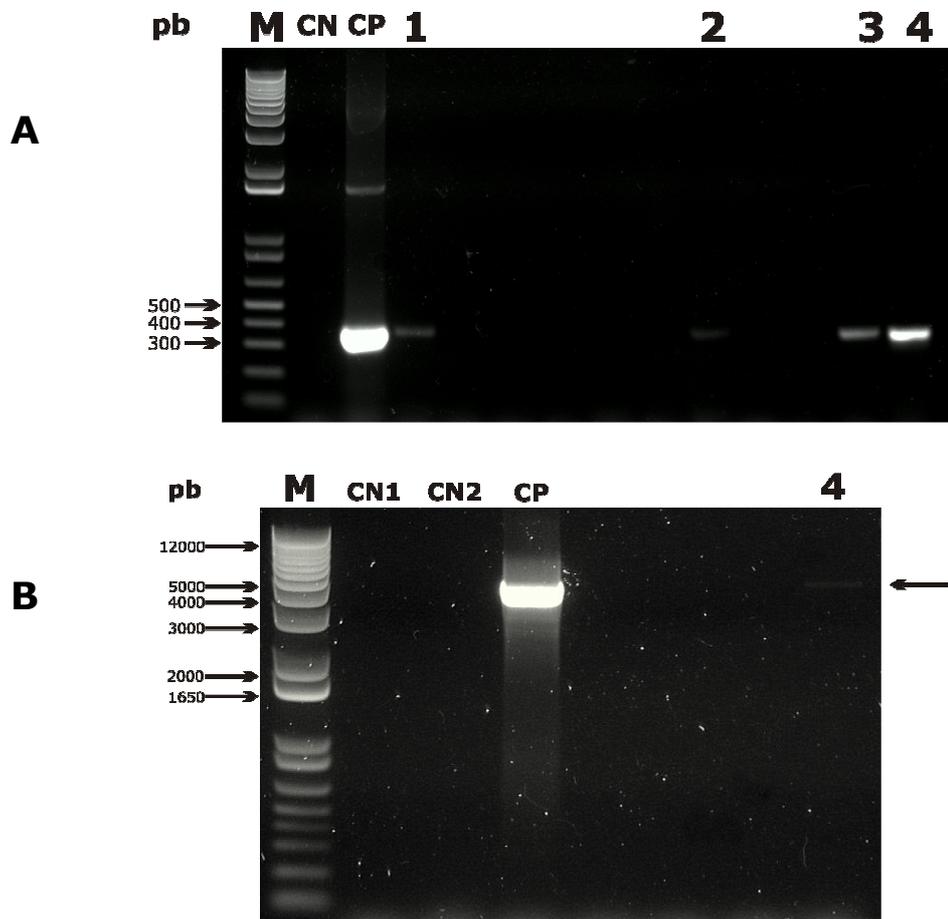
No painel A está representado o *cassette* para a expressão de Jaburetox-2Ec, no painel B, o *cassette* para a expressão da marca de resistência a glifosinato de amônio e no painel C, o plasmídeo pPZP::JAB::BAR. Sítios de clivagem para as enzimas de restrição estão demarcados; BD, borda direita e BE, borda esquerda do vetor binário pPZP201BK. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para confirmações estão representados com setas. O tamanho das sequências correspondentes está indicado em pares de bases (pb).

### 3.4.2. Seleção de Transformantes de *M. anisopliae*

A partir do co-cultivo de esporos de *M. anisopliae* com células de *A. tumefaciens* transformadas com pPZP::JAB::BAR, foram isoladas 156 colônias fúngicas capazes de se desenvolver em meio seletivo (glifosinato de amônio, 250µg/mL). Foi realizada uma primeira busca por transformantes positivos para a inserção da construção através de amplificação de regiões inseridas. Utilizando como molde DNA extraído de esporos em forno de microondas, dos 28 transformantes analisados (os primeiros que esporularam em meio sólido em placas de Petri), 12 apresentaram *amplicons* dos tamanhos esperados.

Na Figura 4 podem-se observar os produtos de amplificação das reações de PCR realizadas. A presença do produto de amplificação referente ao peptídeo Jaburetox-2Ec foi observada nas reações positivas nas canaletas 1, 2, 3 e 4 na Figura 4A. Nesta reação foram utilizados os oligonucleotídeos JabF e JabR, posicionados ao longo da construção na Figura 3, os quais amplificam um fragmento de 372 pb. As reações positivas foram observadas para os transformantes t139, t142, t151 e t156. Nesta figura podem ser observadas duas bandas superiores ao tamanho do produto de amplificação esperado na canaleta do controle positivo (CP). Estas duas bandas são provavelmente duas formas do DNA plasmidial de pPZP::JAB::BAR utilizado como controle positivo, o que indica uma utilização excessiva de molde na reação de PCR e concorda com a forte intensidade da banda correspondente ao produto de amplificação esperado.

Para confirmar a inserção dos dois *cassettes* foi realizada uma reação utilizando-se os oligonucleotídeos JabF e BarR (posicionados na Figura 3), os quais geram um produto de amplificação de 3.854 pb. Este fragmento amplifica a região codificante de Jaburetox-2Ec, o terminador tTrpC, o promotor pANgpdA e a região codificante do gene *bar*. Na Figura 4B, canaleta 4, pode ser observada uma banda referente a este produto de amplificação, o que confirma a presença da construção no transformante t139.



**Figura 4.** Confirmação da inserção dos *cassettes* contendo Jaburetox e o gene *bar* por amplificação das regiões correspondentes utilizando como molde DNA extraído de esporos em forno de microondas. No painel **A**: Amplificação da sequência referente à Jaburetox-2Ec (372 pb). CN – DNA da linhagem selvagem E6; CP – DNA do plasmídeo pPZP::JAB::BAR utilizado na transformação; 1, 2, 3 e 4 – transformantes positivos para inserção do *cassette* de expressão de Jaburetox. No painel **B**: Amplificação da região compreendida entre *primers* JabF e BarR (~3.854 pb). CN1- sem molde; CN2 – DNA da linhagem selvagem E6; CP – plasmídeo pPZP::JAB::BAR utilizado na transformação; 4 – transformante positivo (t139) para inserção dos dois *cassettes*.

Após confirmação pela amplificação dos produtos esperados nesta primeira busca, quatro dos transformantes positivos (t139, t142, t151 e t156) foram inoculados em meio líquido e cultivados para extração de DNA micelial. A extração de DNA de esporos em forno de microondas apresentou-se como uma boa alternativa para realização de *screening* inicial em um grupo grande de transformantes. No entanto, esta amostra não é pura e deve ser utilizada preferencialmente logo em seguida a extração, pois é instável e apresenta degradação quase completa dos ácidos nucleicos após permanecer a 4°C overnight. Portanto, uma nova reação de PCR foi realizada utilizando como molde amostras de DNA puras, extraídas de micélio das linhagens transformantes e selvagem.

Nesta segunda reação também pode ser observada a confirmação da inserção dos *cassettes* no genoma das linhagens transformantes, a partir da detecção dos produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores JabF e JabR (dados não apresentados).

Não foram observadas alterações morfológicas entre os esporos das linhagens recombinantes e da linhagem selvagem. O desenvolvimento micelial das linhagens transformantes também não apresentou diferenças. De maneira geral, as linhagens transformantes se desenvolvem em um período de tempo mais longo quando cultivadas em meio sólido contendo glifosinato de amônio (STAATS *et al.*, 2007). Após confirmações, foi realizada extração de proteínas intracelulares das linhagens transformantes a partir de micélio.

### 3.4.3. Análise da Expressão de Jaburetox-2Ec por Western de Fração Intracelular

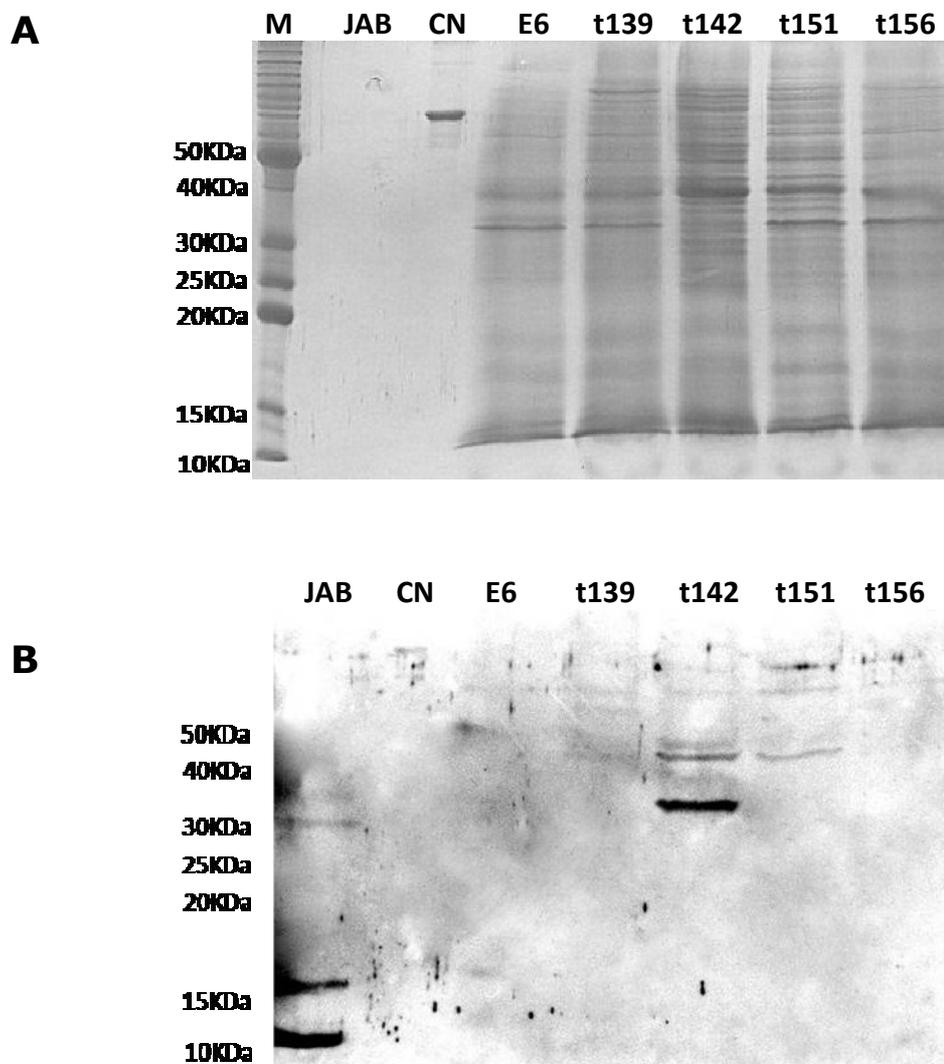
A confirmação dos transformantes também foi avaliada pela presença do peptídeo nas frações intracelulares do fungo detectada por ensaio de *Western blot*. Após extração de proteínas totais a partir de micélio dos transformantes, as mesmas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE. Na Figura 5A pode ser observado o padrão de bandas protéicas referentes aos quatro transformantes e à linhagem E6. Uma duplicata destas mesmas amostras foi transferida para uma membrana de hibridização e submetida à reação com anticorpo anti-Jaburetox-2Ec. O tamanho esperado de Jaburetox-2Ec é de ~12,86 kDa, sendo ~10,12 kDa de Jaburetox e ~2,75 kDa do epitopo V5, de acordo com predição pelo software Compute

pI/Mw. No entanto, pode ser observada a presença de diversas bandas de tamanhos maiores do que o esperado na canaleta em que foi aplicada Jaburetox-2Ec e principalmente no transformante t142 (Figura 5B). De acordo com o sinal de hibridização resultante, o peptídeo parece estar formando agregados com tamanho superior a 30 kDa. A ausência de bandas no extrato protéico da amostra selvagem indica que o anticorpo anti-Jaburetox-2Ec não está reconhecendo nenhuma possível urease fúngica. Em uma análise preliminar no rascunho de genoma de *M. anisopliae* (utilizando a sequência da urease JBURE-II e o algoritmo tBLASTn no programa BioEdit), é encontrada uma provável urease, com tamanho predito de ~82 kDa (utilizando a ferramenta Compute pI/Mw), o que também indicaria que as bandas fortemente imunorreativas e menores do que 50 kDa não correspondem a uma possível urease de *M. anisopliae*. No entanto, algumas bandas mais fracas e mais altas no painel B, podem corresponder a esta urease fúngica.

A formação de agregados do peptídeo Jaburetox-2Ec foi citada por Stanisçuaski *et al.*, (2009), podendo ser formada quando o peptídeo se apresenta em altas concentrações. Barros *et al.* (2009) confirmaram que após estoque do peptídeo em soluções a 4°C, o mesmo forma agregados que são incapazes de promover a sua ação sobre as vesículas. Jaburetox-2Ec induz a desestruturação das vesículas, mas após armazenamento prolongado de uma solução deste peptídeo a 4°C é observada a formação de agregados da proteína. Os agregados insolúveis gerados sob estas condições são resistentes tanto a tratamentos térmicos quanto a agentes químicos como uréia ou detergentes. Barros *et al.* (2009) indicam que a agregação de Jaburetox-2Ec é inversamente relacionada a sua habilidade de promover a dissociação de vesículas; tratamentos de alta pressão dissociam os agregados apenas parcialmente e DTT atrasa o processo de agregação mas não é efetivo na reversão dos agregados a forma monomérica. Dessa forma, a formação destes agregados pode reduzir a atividade inseticida. Como a amostra aplicada nos géis foi liofilizada, pode ser que a mesma tenha formado os agregados após a extração das proteínas intracelulares e não indica necessariamente que os agregados sejam formados no citoplasma do fungo. Outro experimento deve ser considerado, o qual não utilize nenhum método de tratamento da amostra anteriormente a sua aplicação no gel.

Como pode ser observado no painel A, a canaleta onde foi aplicada a amostra de Jaburetox-2Ec não apresentou marcação com o corante Coomassie. Mulinari (2008) afirma que o anticorpo anti-Jaburetox-2Ec produzido apresenta forte imunoreatividade contra o

peptídeo Jaburetox-2Ec, reconhecendo até 0,1 µg do peptídeo em diluições de até 1:30.000. Observando o painel B, onde foi aplicada a mesma amostra que no gel do painel A, a detecção de bandas do peptídeo pode ser visualizada.



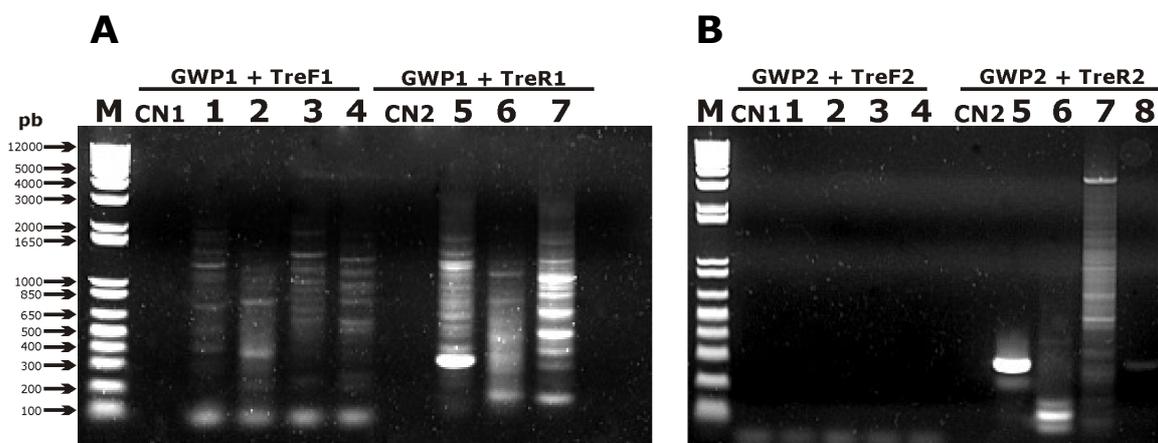
**Figura 5. Análise de proteínas intracelulares e de Jaburetox-2Ec nos transformantes (t139, t142, t151 e t156) e na linhagem selvagem E6.** No painel A: Eletroforese de proteínas intracelulares por SDS-PAGE. JAB – solução contendo Jaburetox-2Ec; CN – solução de BSA; E6 – extrato protéico da linhagem selvagem; t(x) – extrato protéico dos transformantes. No painel B: Detecção do peptídeo Jaburetox-2Ec na fração protéica intracelular por *Western blot*. Uma duplicata das amostras do painel A foram aplicadas em um segundo gel a partir do qual foi realizada a transferência. Marcador de proteínas *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

#### 3.4.4. Isolamento da Sequência da Trealase Ácida de *M. anisopliae*

Foi possível, através da técnica de *Genome Walking*, isolar um fragmento correspondente à região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae*, linhagem E6. As bandas resultantes das reações primária e secundária podem ser observadas na Figura 6. Como pode ser observado nesta figura, apenas a reação secundária, que utilizou o oligonucleotídeo iniciador gene específico reverso (TreR2) como reagente, resultou em produtos de amplificação diversos.

O desenho dos oligonucleotídeos gene específicos, de acordo com a metodologia *Genome Walking*, deve ter como base uma região da sequência de nucleotídeos conhecida do gene de interesse para permitir o anelamento correto dos *primers* e a descoberta da região adjacente não conhecida. Os *primers* utilizados neste trabalho foram desenvolvidos com base na sequência da trealase ácida ortóloga pertencente a *M. acridum* (ZHAO *et al.*, 2006). Após análise da sequência da trealase ácida isolada neste trabalho, foi observada uma grande diferença entre as regiões promotoras destes genes ortólogos. Pôde-se perceber que o *primer* TreF1 apresenta oito *mismatches* em relação à sequência de *M. anisopliae* E6. Essa diferença provavelmente determinou a geração de produtos de amplificação inespecíficos na reação primária, os quais são utilizados como molde da reação secundária. Da mesma maneira, o *primer* TreF2 também apresenta 6 *mismatches* em relação a sequência da linhagem E6. Como resultado, houve baixa eficácia da reação secundária, que utiliza um oligonucleotídeo *nested* (TreF2), ocasionado na ausência de produtos de amplificação. Já os *primers* TreR1 e TreR2 apresentam apenas dois e um *mismatches*, respectivamente.

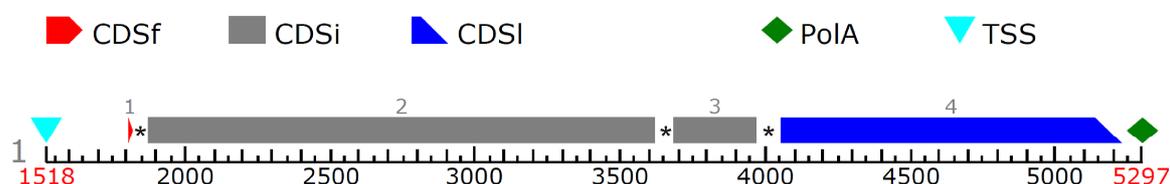
Após reação primária e secundária, foi possível recortar dos géis de agarose e clonar três regiões de tamanhos diferentes. As bandas clonadas e sequenciadas foram: (i) uma banda de ~313 pb amplificada a partir da biblioteca *SmaI* (canaleta 5, Figura 6B), (ii) uma banda de ~930 pb amplificada a partir da biblioteca *HincII* (dados não demonstrados) e (iii) uma banda de ~1.300 pb obtida a partir da utilização dos *primers* gene específicos (TreF2 e TreR2) tendo como molde DNA genômico não clivado. Após sequenciamento dos fragmentos clonados em pUC18, montagem e empilhamento das sequências resultantes, foi possível obter uma região de 900 pb correspondente a uma região da trealase ácida.



**Figura 6. Reação primária e secundária para isolamento da região promotora do gene da trealase ácida por *Genome Walking*.** GWP1 – *primer* adaptador *Genome Walking* 1, GWP2 – *primer* adaptador *Genome Walking* 2, TreF1 e TreR1 – *primers* gene específico senso e anti-senso da primeira reação, TreF2 e TreR2 – *primers* gene específicos *nested*, M– Marcador 1 kb Plus DNA Ladder, CN1 e CN2 – controle negativo sem molde. No painel A: Reação primária de PCR. 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 – amostras molde oriundo das bibliotecas *SmaI*, *RsaI*, *StuI* e *PvuII* respectivamente. No painel B: Reação secundária de PCR. 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8 – molde oriundo das bibliotecas *SmaI*, *RsaI*, *StuI* e *PvuII* respectivamente.

Análises *in silico* da sequência gênica isolada demonstraram homologia, apesar de baixa identidade, com a região a montante do sítio de início da tradução da trealase de *M. acridum* previamente descrita. A sequência isolada neste trabalho compreende em torno de 700 nucleotídeos da região a montante do ATG e em torno de 200 nucleotídeos a jusante do ATG. Estes 900 pb isolados também foram comparados com os dados recém obtidos do rascunho referente ao sequenciamento do genoma de *M. anisopliae* E6 em andamento. A partir dessa comparação, foram desenhados oligonucleotídeos específicos mais externos aos 900 pb para amplificar a região de 1.500 pb contendo o promotor e o peptídeo sinal preditos do gene da trealase ácida. As predições seguintes foram realizadas utilizando a sequência completa da trealase ácida, oriunda dos dados do sequenciamento, e não somente os 900 pb isolados neste trabalho.

De acordo com a predição realizada pelo software FGENESH, a ORF da trealase ácida de *M. anisopliae* possui 3.228 pb, contém quatro éxons e três íntrons (Figura 7). As regiões 5'UTR e 3'UTR contém 245 pb e 70 pb respectivamente. Os sítios de *splicing* na extremidade dos íntrons apresentam as sequências canônicas conservadas de eucariotos ('GU...AG') e o tamanho dos íntrons 1, 2 e 3 é de 56, 61 e 81 pb, respectivamente. Entretanto, podem existir algumas variações no tamanho dos íntrons e éxons, pois a predição realizada pelo software Augustus resultou em pequenas diferenças no tamanho dos íntrons 1 e 3. Estas diferenças não ocasionariam mudanças na fase de leitura, mas somente o acréscimo de 3 aminoácidos no éxon 2 e 5 aminoácidos no éxon 4. Como pode ser observado mais adiante na Figura 10, no alinhamento entre trealases ácidas de outros fungos e de *M. anisopliae* E6, pode-se perceber que a predição mais provável em relação ao íntron 3 seja aquela resultante do programa Augustos já que os aminoácidos acrescentados no último éxon estão presentes também nas outras sequências comparadas. Já as diferenças no primeiro íntron não são resolvidas neste mesmo alinhamento, pois a região amino-terminal da proteína apresenta menor conservação.



**Figura 7. Predição da ORF da trealase ácida de *M. anisopliae* pelo software FGENESH 2.6.** CDSf – Primeira região codificante (CDS) em vermelho, CDSi – regiões codificantes internas em cinza, CDSI – Última região codificante em azul escuro, PoIA – sequência de reconhecimento para cauda de poliadenilação em verde, TSS – Sítio de início da transcrição (posição do TATA-box) em azul claro. Números acima das regiões codificantes representam éxons 1 a 4 e \* representam os íntrons 1a 3.

A trealase ácida de *M. anisopliae* predita neste trabalho apresenta 1.080 aminoácidos (Figura 8). Ela contém uma sequência peptídeo sinal putativa com um potencial sítio de clivagem localizado entre os resíduos Ala26 e Ala27 (VQA26↓27AH), preditos pela ferramenta SignalP. A sequência Ala–X–Ala é frequentemente observada em

sítios de processamento do peptídeo sinal de proteínas secretadas em bactérias e eucariotos (VON HEIJNE, 1983; NIELSEN *et al.*, 1997). A região correspondente ao peptídeo sinal (aminoácidos 1 ao 26) é interrompida pelo primeiro íntron. Este mesmo padrão também foi observado em outras trealases ácidas preditas que apresentaram similaridade com a trealase ácida de *M. anisopliae* E6 em uma busca no banco de dados do NCBI utilizando a ferramenta BLASTp. Entre as sequências de trealases ácidas resultantes desta busca, foram detectadas representantes que pertencem a espécies de *Aspergillus* (números de acesso do NCBI: XP\_001273664.1, XP\_748551, XP\_001258886, XP-002380869.1 e XP-001823820.1). Além destas, também foram detectadas trealases ácidas de *Penicillium chrysogenum* (XP\_002561487.1), *Coccidioides immitis* (XP\_001241302.1), *Uncinocarpus reesii* (XP\_002543027), entre outras. Tanto a presença de um íntron interrompendo o peptídeo sinal, como a detecção da presença de três íntrons na maioria destas sequências, foram visualizadas através da utilização da ferramenta *Sequence View*, disponível no NCBI.

A proteína madura de *M. anisopliae* E6 apresenta 1.054 aminoácidos, ponto isoelétrico teórico de 5,43 e massa molecular de 114.255,04 Da, preditos pela utilização da ferramenta Compute pI/Mw. Estas predições assemelham-se com as encontradas para a proteína Atm1p (*M. acridum*), que apresenta 1.053 aa, pI de 5,2 e massa molecular de 114,3 kDa (ZHAO *et al.*, 2006). A trealase ácida (EC 3.2.1.28) apresenta três domínios (analisados no InterProScan) característicos das glicosil hidrolases da família 65 (GH65, CAZy): GH65 N-terminal (pfam03636), GH65 central catalítico (pfam03632) e GH65 C-terminal (pfam03633), os quais podem ser observados na Figura 8. O domínio central, compreendido entre os 410-771 aa, contém o sítio catalítico desta enzima. Acredita-se que o domínio N-terminal (70-342 aa) pode estar envolvido na atividade catalítica, mas sua função exata ainda é desconhecida. O domínio C-terminal é menor (778-813 aa) e a sua função ainda não foi determinada nesta classe de enzimas.

A maioria das células fúngicas apresentam duas trealases, chamadas de neutra e ácida, baseado no pH em que apresentam atividade ótima. As trealases neutras são intracelulares e as trealases ácidas apresentam peptídeo sinal N-terminal e podem ser secretadas ou ligadas à parede celular (JORGE *et al.*, 1997). Zhao *et al.* (2006) detectou a expressão dos transcritos do gene *ATM1* que codifica a trealase ácida de *M. acridum* na hemolinfa do gafanhoto *Locusta migratoria* após infecção. Considera-se a trealose como

uma potencial fonte nutritiva para os fungos quando estes atingem a hemolinfa após penetração através da cutícula do inseto.

Este mesmo grupo (XIA *et al.*, 2002) mostrou que *M. anisopliae* assimila a trealose do hospedeiro através da secreção de hidrolases e absorção dos produtos desta hidrólise utilizando trealose marcada com carbono 14. A enzima Atm1p purificada por este grupo apresentou atividade específica para trealose. A temperatura ótima para a atividade da enzima foi de 30°C, a mesma temperatura ótima para a patogênese, e o pH ótimo de 5,5 também se aproxima do pH da hemolinfa de gafanhotos (em torno de 6,0) (ZHAO *et al.*, 2006).

Um dos objetivos de construir um vetor contendo o promotor e o peptídeo sinal da trealase ácida é a possibilidade destes elementos promoverem a secreção de proteínas recombinantes. Como foi observado para o gene ortólogo de *M. acridum*, a trealase ácida Atm1p foi secretada em grandes quantidades em meio de cultivo e houve apenas mínima atividade intracelular ou ligada à superfície do esporo. Este fato diferencia-se de outras trealases ácidas que foram detectadas ligadas à superfície dos esporos e do micélio ou em vacúolos (d'ENFERT & FONTAINE, 1997; JORGE *et al.*, 1997; AQUINO *et al.*, 2005), enquanto a secreção em meio é considerada menos frequente. Zhao *et al.* (2006) sugerem que esta possa ser uma adaptação ao parasitismo, já que uma forma secretada permitirá a assimilação da trealose a partir da hemolinfa do hospedeiro.

Uma das possibilidades de ligação à parede celular está relacionada à modificação pós-traducional que adiciona âncoras de GPI às proteínas (ORLEAN & MENON, 2007). Após análise da sequência predita da trealase ácida de *M. anisopliae* E6 no software Big Fungal Predictor não foi encontrada nenhum possível sítio de ancoramento a GPI. Apesar de esta predição indicar que esta proteína provavelmente não apresenta este tipo de modificação, a possibilidade de ligação à parede celular não deve ser excluída.

Uma das características já descritas para as trealases ácidas são o seu alto nível de glicosilação (JORGE *et al.*, 1997; ELBEIN *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2009). Foi possível encontrar 27 potenciais sítios de glicosilação (Asn) utilizando a ferramenta ScanPROSITE; resultado este comparável aos 30 sítios preditos para Atm1p citados em Zhao *et al.* (2006). Estes autores isolaram a trealase ácida como uma glicoproteína com 170 kDa, e após deglicosilação da mesma, a massa molecular diminuiu para aproximadamente 130 kDa observado em gel de SDS-PAGE. A modificação pós-traducional de proteínas por

glicosilação está relacionada a proteínas que entram na via de secreção (WALLIS *et al.*, 1999). Os sítios de glicosilação preditos estão indicados na Figura 8.

```

1 : ATCCgcgcgactgtgagtcaccagacccttcaacatgtgattgaccgtgtttcggccactgacacagacggcggaagctcatccaagcgccgctctggc :
1 : M R A T T                               intron 1                               T R Q L I Q A A V V A :
101 : cgcgaccctcggctctctcgcagcgcgctccaggccgccatggcaaaagaccgctgcgcaaatgctcggcggtacagcgccagaccgagccgctaac :
16 : A T L G L C S A V Q A A H G K D R V A K C L A R Y S G Q D R G R N :
                                pep_sinal 26^27
201 : cgcacaaccgtgtacaagacggactttcccggcgtcacctgggatgacgacaactggctcctcagcaccacagcgtcgcagcaagccggttatcagtcga :
49 : R T T V Y K T D F P G V T W D D D N W L L S T T T L E Q G R Y Q S :
                                GH65 N-terminal
301 : gaggtctgtttgccaatggtactttggcatcagcgtggccagcgtggccctctttgagctcgcagccggagcagggcgcgacgtcatcaacgg :
82 : R G S V A N G Y F G I S V A S V G P F F E L D A E D E G G D V I N G :
401 : ctggcgcgtcttcccgcgctcagctcctttgccaccattgcccgtttctggaacgccagcccgagaccaacggcaccactttggctggctgctgcag :
116 : W P L F S R R Q S F A T I A G F W N A Q P E T N G T N F G W L L Q :
501 : tacggctcagagagcvtctagcggcgtgctcactggagcggcctggtgctcagcctcggcaacggcatcactggactccacggctcgataacaag :
149 : Y G Y E S V I S G V P H W S G L V L D L G N G I Y L D S T V D N K :
601 : ctattagcaactttcgcctccactcagacttcaagggcggagtctcagctggctgatacgtggccccgctcggcggaacaatggctcctcagacat :
182 : T I S N F R S T Y D F K A G V L S W S Y T W S P S A G N N G S Y D I :
701 : ccggtacttgatgtttcaacaacaagcttcacateaccagggcgttggatctggagatgtcccgtcggggatgccaatgccaccgctgtcaacgct :
216 : R Y L M F T N K L H I N Q A V V D L E I V P S V D A N A T V V N V :
801 : cttgatggctattccggcgtcgaaccgactttgtccagctcctggcaggaatgctggccctcactcggccgctcggccaccgctcggcaatgga :
249 : L D G Y S A V A R T D F V Q S G E D A G A I Y S A V A R P T G I A N V :
901 : ctgcatacattacgccaacatgacgggctccgacgctgcacatggccgcaagactcggcagcaacacccctacattcgaagaacgactcttc :
282 : T A Y I Y A N M T G S D D V D I G R K T L V S N K P Y I R K N E S S :
1001 : tattgccagccgctcccgcctcgcattctcccgccgcaagggcggtaggattacaanaatcagtcggccggcgctccggagatgctttgccgatccg :
316 : I A Q A V P V A F S A G K A V R I T K Y V G A A S G D A F A D P R :
1101 : caggtggccaagaatgcccgctcgtcggccttgcaccggcctttacaagtctctcgttctcagctccaggagtggaagcagctcatgcccgaccact :
349 : Q V A K N A A S S A L S Q G F Y K S L R S H V Q E W D D V M P D H :
1201 : cggtcgacagctatgctgacccccgacaacggaaactctgccccagacagctacattatcgactcggctatcatcggcggcgcccaacacgtactacgct :
382 : S V D S Y A D P D N G T L P Q D S Y I I D S A I I A V A N T Y Y L L :
                                GH65 central
1301 : gcagagtacagtcggaccaaacgcccaaaagtctggtcaaggacgccccctcaacgtggacagcatctcggtcggaggcttggctgctgactgaccc :
416 : Q S T V G P N A Q S L V K D A G T C P V N V D S I S V G G L V S D S Y A :
1401 : ggtctcacttttgggatgccagcctgtttgcaaccggcgtcgtgctcgcacccccagctcggcagcgaatcaccaactatcgcgtcaacaagt :
449 : G L I F W D A D L F M Q P G L V V S H P Q S A E R I T N Y R V N K :
1501 : acggccaagccaagcgaatgcgcagacaactcaccagctcacaagaacagcggcttttccaaggaacggcgccatcccctggacgagcggctg :
482 : Y G Q A K A N A Q T S Y T S S Q N K T V F S K D A A A F P W T S G R :
1601 : ttttggcaactgcaccgccaccggccttgcgtgggactaccagctaccatctgaacggagatattggcatatcgtttgtcaaccagctcgtcgcagcgggc :
516 : F G N C T A T G P C W D Y Q Y H L N G D I G I S F V N Q L V A T G :
1701 : gacacggctactttaaaccgagacgttccagctatcagactccacgcaacgctcctttcaaaccttttggctccggaatggctcaccctcggcagctga :
549 : D T R Y F N E S L F P V Y D S I A T L F S N L L A P N G S S W T V :
1801 : aaaacatgacggatcccgtgctgattttgtaactcggaccagccattttgctcgtgctgtaacttatgatggacagcagagatgcaaacaccgctg :
582 : K N M T D P                               intron 2                               D E Y A N H V :
1901 : acgagcggctacagctgctctgattgcccgaacgctgcaactgcaacacgcttccgggaacagtttggcctcagaaaaacgcaacgtgggactc :
595 : D A G Y T M P L I A E T L Q T A N T F R E Q F G F G L E K N A T W D S :
2001 : catggccaccaacgctgttttccctccgagagaatggcgtcacactcagcttaccaccatgaacgggagtgccgtggtgaagcggctgacgtgatattg :
629 : M A T N V L F L R E N G V T L E F T T M N G S A V V K Q A D V I L :
2101 : aacacgttcccgctcctcacaacaactacaccaccagagtgctcagctcagcactggactatgtagtagcagcctccatggctgcttccccc :
662 : N T F P A L S Y T T N Y T T Q E S L N D L D Y                               intron 3
2201 : tgaaccgcaaacagactaacgcccgtgcccgaactcgcacaacaacagctcgcagcagggccggccatgacgtgggcttcttccatcattgccaacg :
684 : Y A N K Q S P D G F A M T W A F F S I A N                               intron 3
2301 : acatctcgcctctggtgctcggcctacacctactcagctactcgtacagccgctacgcccggcggccttttaccagctctcagagcaactgattga :
706 : D I S P S G C S A Y T Y S Q Y S Y K P Y A R A P F Y Q L S E Q L I D :
2401 : caatgccaccatcaacggcggcaccaccggcgtacccttctcaccggcaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc :
740 : N A T I N G G T H P A Y P F L T G H G G A N Q V N V F G Y L G L R :
2501 : ctgctcccgcagcgcgcttcaacatcaaccaccacgctgcccgcagctgctgcacactgcgctaccggacctttactggcggctggccttccg :
773 : L L P D D A L H I N P N L P P Q L S H L R Y R T F Y W R G W P F A :
                                GH65 C-terminal
2601 : cctcgtccaacgcagcgcacacagcggctccggcgcggcggcagcgtccggcggcctcccctcggcgggaccggcgtctcgccaacgcaaccatcaccatoga :
806 : A S S N A T H T T V R R A R H V R P L P S A D P R F A N A T I T I D :
2701 : cgcggcgccgcaagcggcaacgccaccggctaccacctgcccgtggagcggcggcggcgtcgtgcccaccgcaacatggccgcatcaacaccacccccggc :
840 : A G A D G N A T A Y H L P V D G A A V V P N R N I G R I N T T P G :
2801 : aacctcctcagctcggctcggcggctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc :
873 : N L L Q C R S A D S P G A H R P G Q F P I G A V D G A T S T K W Q :
2901 : cgcagtagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc :
906 : P Q Y A A N L S A V T V M L A P D D V G A M V S G L H F N W A Q A P :
3001 : gccgctcaacgccaccgctcgtctttcaaacgccaccatcgccagcttccggcagctggatgtcggcgcaagaaggcgctgagtagcaccgctcgtg :
940 : P V N A T V V F H N A T I A S F A D V D V S A Q K K G A E Y T V V :
3101 : acgcaactggcgggctgcccgtgccaaccctacagcgtgagggcagcaaccttgatgctattgctatcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc :
973 : T H L A G V P L S N P Y S V Q A T N L D A I A I P V G N T T N V T :
3201 : ttggcaggctgctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc :
1006 : L G Q A V P A R Y A T L L I V G N Q G L G Q R D V D A K N G T G A :
3301 : taggtggcggagtgggcgattatcagtgatgacagggaggaagtaggtggggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg :
1040 : T V A E W A I I S D D R R K M D G E A A P A K M R R S L T W R E E :
3401 : gggatgctgagggtagaccgtatcaacttttggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc :
1073 : G M L M G R P Y *

```

Sítios de glicosilação preditos       Introns 1 ao 3  
 Peptídeo Sinal predito       Domínios da família GH65  
(N-terminal, Central e C-terminal)

**Figura 8. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da trealase ácida de *M. anisopliae* predita.** Os números ao lado das sequências representam a posição dos nucleotídeos e dos aminoácidos - em negrito. Sequência de aminoácidos referentes ao peptídeo sinal predito está destacada em fundo azul claro. O sítio de clivagem do peptídeo sinal predito está indicado com uma seta (entre os aa VQA26–27AH). As três regiões da sequência de aminoácidos destacados em fundo cinza escuro representam os três domínios da família GH65 (N-terminal, Central e C-terminal). As regiões da sequência de nucleotídeos destacados em fundo cinza escuro representam os três íntrons preditos e as regiões destacadas em fonte branca (nos íntrons 1 e 3) representam as diferenças nas predições dos sítios aceptores de *splicing* obtidas pelos softwares FGENESH e Augustus. As asparaginas (N) dos sítios de glicosilação estão demarcadas com fundo amarelo. \* - códon de terminação.

Há uma maior disponibilidade de informações referentes às trealases neutras, e os dados relacionados à localização, regulação e função das trealases ácidas fúngicas são escassos (PARROU *et al.*, 2005). A maior parte das sequências de trealases ácidas disponíveis são predições contidas em bancos de dados, enquanto estudos experimentais que envolvem o isolamento gênico, a análise da região reguladora e da proteína ainda são pouco numerosos (ELBEIN *et al.*, 2003). A análise da região promotora destes genes é pouco estudada, mas é sugerido que a mesma deve apresentar os elementos de repressão catabólica por glicose, pois a expressão desta enzima é baixa durante o crescimento exponencial de *S. cerevisiae* e alta durante a fase estacionária subsequente (NWAKA *et al.*, 1995). No fungo filamentosso *A. nidulans*, a trealase ácida TreA é expressa na etapa de germinação do esporo e decai rapidamente atingindo níveis quase não-detectáveis durante a fase exponencial de crescimento. A atividade dessa enzima também atinge níveis maiores durante a fase estacionária de crescimento e durante a diferenciação do conidióforo (d'ENFERT & FONTAINE, 1997).

Em relação à região promotora da trealase ácida, na análise realizada na região promotora isolada foi possível detectar alguns dos elementos canônicos presentes em promotores eucarióticos. A predição realizada pela ferramenta FGENESH detectou a presença de um potencial TATA-box localizados a 283 nucleotídeos a montante do sítio de início da tradução (Figura 9). À jusante deste sítio TATA-box, e posicionado a 245 nt à montante do ATG, pode ser encontrado um potencial sítio de início da transcrição (SIT) contido na sequência CCA<sub>+1</sub>GTC, a qual se assemelha a sequência iniciadora (Inr) conservada Py Py A<sub>+1</sub> N T/A Py Py (ou T C A<sub>+1</sub> G/T T T/C) característica de eucariotos (SMALE & KADONAGA, 2003). Foi detectada também a sequência CAAT-box, sítio de ligação ao fator de transcrição C/EBP (CAATT-box/*Enhancer Binding Protein*).

Um sítio de início da transcrição (SIT) eucariótico diferente do anterior foi predito na região localizada a 80 nucleotídeos a montante do ATG utilizando a ferramenta *Neural Network Promoter Prediction*. Este sítio apresenta a sequência TCGAAT, sendo G o nucleotídeo +1. A montante deste sítio também se encontra outro potencial TATA-box predito, contido na sequência TATAAA. As duas possibilidades dos sítios canônicos acima citados estão demonstradas na Figura 9. Portanto, dados experimentais são necessários para determinar os sítios corretos.

Além disso, alguns dos sítios de ligação a fatores de transcrição que foram detectados na região promotora deste gene também estão demonstrados na Figura 9. Podem ser detectados três sítios de ligação ao fator CREA (CCCCA/GC), o qual media a repressão catabólica por carbono, localizados a 575 nt a montante do SIT na fita senso e a 540 nt e 75 nt a montante do SIT na fita anti-senso. A trealase ácida de *A. nidulans* apresenta quatro potenciais elementos CREA em tandem na região promotora deste gene (ENFERT & FONTAINE, 1997). Inúmeros outros sítios de transcrição foram detectados nas predições realizadas pelas ferramentas TESS (*Transcription Element Search System*), JASPAR Database (*JASPAR Core Fungi*) e AliBaba. No entanto, foram ilustrados na Figura 9 apenas aqueles mais coerentes com a região reguladora em estudo. Todos os elementos reguladores precisam ser comprovados experimentalmente para que possa ser determinado o tipo de regulação que ocorre na região promotora do gene da trealase ácida.



Na análise do alinhamento resultante entre as trealases ácidas de *M. anisopliae* e de outros fungos filamentosos pode-se perceber a presença de regiões conservadas ao longo de toda sequência, principalmente na região central das mesmas, enquanto as regiões amino- e carboxi- terminal são mais divergentes. Os três domínios da família 65 das glicosil hidrolases estão contidos nas regiões de alta conservação. Os aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica destas enzimas ainda não foram descritos, no entanto, é provável que eles estejam contidos nas regiões altamente conservadas presentes no domínio central catalítico (Figura 10).

A trealase ácida de *M. anisopliae* apresentou níveis de identidade elevados com as outras trealases os quais variam entre 53% e 61%. A proteína de *A. terreus* apresentou a menor identidade com *M. anisopliae* (53%), seguido de *U. reesii* (54%), *A. niger* (56%), *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. oryzae* (59%), *F. oxysporum* (60%), sendo que *A. fumigatus*, *A. fischeri* e *A. clavatus* apresentaram maior identidade (61%). Ainda, os níveis de similaridade entre as sequências protéicas variaram entre 66% e 75%. O resultado deste alinhamento entre trealases ácidas indica que a sequência isolada neste trabalho corresponde a trealase ácida de *M. anisopliae* E6. Tanto a presença dos três motivos GH65 preditos quanto a alta identidade com outras trealases suportam esta conclusão.

```

ANID_09340      1  :--MRFKSVFTLLPLIAQ---LP-SGGASLPNNHGRVENCVRNHDCI-HKF---RH----S-NNTYQSMFPGVVTWDEDQWVLTSSLDQGHYQSRGVSANG : 85
ATEG_07476     1  :-----MKPITSTVLAALLLPAAAL-----DSRVSRIILQRHATSTTANNKDTTPAGVNSSSVYQTRFDGVTWDDHLLSTTTLQGGQFQSRGVSANG : 87
AFL2G_0808     1  :--MKLRNLAPWALLTAVHGLP-SQ-GTQNKHNPRVAKILKRHEGSSQKA---KD----S-NNVYETKFDGVTWDEENWLLKTTTLDQGHYQSRGVSANG : 88
Afu3q02280    1  :--MLSQNLATWVSLAC---LP-AAIGLP-NNNDRVARS LKRHGGHGHKQ-VDTN---S-SHVYKTRFP GVTWDDHLLSTTTLDQGHYQSRGSIANG : 87
ANIR_11020     1  :--MQVKFATLLPLLLH---LP-AAVDGLPGKNARISAS LKRHAGRDVPQ-TALN----S-INVYQTKFSGVTWDEDHLLSTTTLDQGHYQSRGVSANG : 88
AO09012000    1  :--MKLRNLAPWALLTAVHGLP-SQ-GTQNKHNPRVAKILKRHEGSSQKA---KD----S-NNVYETKFDGVTWDEENWLLKTTTLDQGHYQSRGVSANG : 88
NFIA_00344     1  :--MLSKNLATWVSLAC---LP-AAIGLP-NNNDRVARS LKRHGGHGHKQ-VDTN----S-SHVYKTRFP GVTWDDHLLSTTTLDQGHYQSRGSIANG : 87
ACLA_06201    1  :--MLSTNLATWASLAC---LP-ATLAFQTNNHARVTRSLKRHAGHGHTPPTDTN---S-SNIYETRFP GVTWDDNNDWVLA TTTLDQGHYQSRGVSANG : 89
UREG_02543    1  :-----MLFKALLVTFLELDQAPLGF AHRHDPVTDVFDNRNVRSPRFDKRESN----AQSPVYATKFTCVSWDNTNWKLTNTNLDQGHYQSRGSIANG : 88
FOXG_14683    1  :-----MATPHPTKSTTS-----V-PERTEEDNQRLFQLYKSWILTERDGKARHYQSRGVSANG : 52
TreaAcMaE6    1  :MRATTRQIIQ-AAVVAATLGLIC-SAVQAAGHKDRVAKCLARYSGQDRG----RN----R-TTVYKTRFPGVTWDDNLLSTTTLEQGRYQSRGVSANG : 88

```

> GH65 N-terminal

```

ANID_09340      86  :YLGISVSSVGPFFELD-LPVAAGDVINGWPLYSRROSFATISGFFDIQAE TNGSNFPWMLNOYGGESV ISGVPHWSGLILDLDGDDYLDSTVDNVTLSDFKS : 184
ATEG_07476     88  :YLGINVASVGPFFEVLDQEDV-GDVINGWPLYSRROSFATISGFFDYSQATTDSTNFEWLYOYGHDSV ISGVPHWSGLILDLDGDDVYLDATVDNSTISDFRS : 186
AFL2G_0808     89  :YLGINVASVGPFFELD-EEVDGDVINGWPLYSRROSFATIA GFFDSOPTTNGTTFPWLISOYGDWTAISGVPHWSGLILDLDGDDVYLDSTVDDSTITDFQS : 187
Afu3q02280    88  :YLGINVASVGPFFELD-VPVSGDVINGWPLYSRROSFATIA GFFDYOPTTNGSNFPWLNNOYGGESV ISGIPHWSGLILDLDGDDYLDATVDNKTITDFRS : 186
ANIR_11020     89  :YLGINVANIGPFFELD-EPVNGDVINGWPLYSRROSFATISGFWDRQAH TNGSNFPWLSOYGDDSV ISGVPHWSGLILDLDGDDTYLDANVDNRTISNFKS : 187
AO09012000    89  :YLGINVASVGPFFELD-EEVDGDVINGWPLYSRROSFATIA GFFDSOPTTNGTTFPWLISOYGDWTAISGVPHWSGLILDLDGDDVYLDSTVDDSTITDFQS : 187
NFIA_00344     88  :YLGINVASVGPFFELD-VPVSGDVINGWPLYSRROSFATIA GFFDYOPTTNGSNFPWLNNOYGGESV ISGIPHWSGLILDLDGDDYLDATVDNKTITDFRS : 186
ACLA_06201    90  :YLGINVASVGPFFELD-TPVSGDVINGWPLYSRROSFATIA GFFDYOPTTNGSNFPWLNNOYGGESV ISGVPHWSGLILDLDGDDTYLDAAVDNRTISGFFQS : 188
UREG_02543    89  :YLGISVAAVGPFFELD-VPVGDVINGWPLFSRROSFATISGFFDLOPE TNGSNFRWMLNOYGGESV ISGVPHWSGLVLDLDGDDYLDATVNNATISGFVS : 187
FOXG_14683    53  :YLGINVAAVGPFFELDADEEGG-VINGWPLFSRROSFATIA GFFDYOPTTNGTTFPWLLOYGYESV ISGVPHWSGLILDLDGDDVYLDATVDNRTVHNFTS : 151
TreaAcMaE6    89  :YFGISVAVGPFFELDAEDEGGDVINGWPLFSRROSFATIA GFFWNAOPE TNGTTFGWLLLOYGYESV ISGVPHWSGLVLDLDGNGIYLDSTVDNKTISNFRS : 188

```

```

ANID_09340      185  :SYDFKAGVLSWSYTWTP-AGDKGSYAITYRLFANKLNINQAVVDMEITPSQDG--HATIVNVLGDYSAVRTDFVESQED-DGAIYSAVRPWGI PVDVSAFY : 280
ATEG_07476     187  :TYDFKAGVLSWSYTWTP--AGKGSYAITYRLFANKLNITQAVVDMEIVPGADASANATIVNVLGDYSAVRSDFVASGED-DGAIYSAVRPQGI ANVTAYI : 283
AFL2G_0808     188  :TYDFKAGVLSWSYTWSP-A-DKGSFEITYRLFANKLNITQAVVDMEIIPSVDA--NATVANVIDGYSAVRTDFVESGQD-DGALFSAVRPWGISNVTAYI : 282
Afu3q02280    187  :TYDFKSGVLSWSYTWTP-KCNKGSFNITYRLF AHKLVNQAIVVDMEITPSQGS--EATVVNVIDGFSAVRTDFVESGQD-NGALFSAVRPWGISNVTAYV : 282
ANIR_11020     188  :TYDFKSGVLSWSYTWTP-QGNKGSYAITYRLF AHKLVNRAVVDMEITPLTNG--NATVVNVLGDYAAVRTDFVASGQE-EGAIYSAVRPWGVNVTAYV : 283
AO09012000    188  :TYDFKAGVLSWSYTWSP-A-DKGSFEITYRLFANKLNITQAVVDMEIIPSVDA--NATVANVIDGYSAVRTDFVESGQD-DGALFSAVRPWGISNVTAYI : 282
NFIA_00344     187  :TYDFKSGVLSWSYTWTP-KCNKGSFNITYRLF AHKLVNQAIVVDMEITPSQGS--EATVVNVIDGYSAVRTDFVESGQD-NGALFSAVRPWGISNVTAYV : 282
ACLA_06201    189  :AYDFKSGVLSWSYTWTP-TDDKGSFNITYRLFANKLVNQAIVVDMEITPSQES--QATVVNVIDGYSAVRTDFVESGED-DGAIYSAVRPWGI ANVTAYV : 284
UREG_02543    188  :TLDMMKGGILSWSYNWTP-AGGNASFAIAYRLF AHKLVNQAIVVDMEITPSTDG--NATIVNILDGYSAVRTDFVASSGTDGQ-AIYSSVRPDGINNVTAYL : 283
FOXG_14683    152  :TYDFKAGILEWSYTWKP-KDRKGSYQIKYRLF AHKLVNQAIVVDLITVPSDTS--EATVVNVIDGYSAVRSDFVKSQGEDGGIFSAVRPVGI ANVTAYI : 248
TreaAcMaE6    189  :TYDFKAGVLSWSYTWSPSAGNNGSYDIRYLMFTNKLHINQAVVDLEIVPSVDA--NATVVNVLGDYSAVRTDFVQSGED-AGAIYSAVRPTGI ANVTAYI : 285

```

```

ANID_09340      281  :YANLTGSKHVDLSSRRLIHGKPYVSANESSIAQAADVNFVANEKVRITKFVGAAS TDAFPDPQATAKRAVSEALDAGYQRSLSRSHVQEWASIMHEDSVDR : 380
ATEG_07476     284  :YANLTATANVDLSSRRLVTDQPIYSANDSSIAQAVPVRFTPNEPVRITKFVGGAS TDAFADPQOTAKQAASAQAQSAGFQRSLOAHAAEWAYIMNDQSVDR : 383
AFL2G_0808     283  :YTNLTGANVDLSSRALVTGKPYVNTNESSVAQAVNVKFTAKEPVRITKFVGAAS TDAFADPQOTAKEAASAALAAGYKNSLESHASEWANIMHENSVDL : 382
Afu3q02280    283  :YTNLTAAGVLDLTSRALVNDKPYVHSNESSIAQAVDVKFRANETVRI TKFVGAASSDAFPNPQOTAKQAVSAAMGAGYMGSLQSHVEEWASILLDGSVDS : 382
ANIR_11020     284  :YATLDGSDSVDLSSRRIVTDKPYVSTNSSVAQAVDVTF TANETVRI TKFVGGATIDYFLATQETAKAACLAGLADGYVKSLSQSHVGEWATIMHDHSVDR : 383
AO09012000    283  :YTNLTGANVDLSSRRLVTDKPYVNTNESSVAQAVNVKFTAKEPVRITKFVGAAS TDAFADPQOTAKEAASAALAAGYKNSLESHASEWANIMHENSVDL : 382
NFIA_00344     283  :YTNLTAAGVLDLSSRALVNDKPYVHSNESSVAQAVNVKFRANETVRI TKFVGAASSDAFPNPQOTAKQAVSAAMGAGYMGSLQSHVAEWASILLDGSVDS : 382
ACLA_06201    285  :YANLTASKNVDLASHTLVADKPYIHTNESSVAQAVRVNFRANETVRI TKFVGAASSDAFPDPQOTAKQAVSAALGAGYME SLQSHVAEWADILLDGSVDS : 384
UREG_02543    284  :YAQLAGTDEVDLSTLSVISDRPYIRTNDSTIAQAATVNLKSGVTTKITKFVGAAS TDFVDPDRSMADSCSRALNNGYESSLKSHIDEWATVFPSDSVDL : 383
FOXG_14683    249  :YAQVNGSKSLDLSSRRKLVHGKPYVHTNESSIAQAVPVKFSAGVAVRITKYVGAAS SDAFEDPEKTAKEASNRALEEYKESLSSHLEKWEVSMVPSDSDS : 348
TreaAcMaE6    286  :YANMTGSDDDVDIGRKTLSNKPPIRKNESSIAQAVPVAFSAGKAVRITKYVGAAS SDAFADPROVAKNAASALSQGFYKSLRSHVQEWDDVMPDHSVDS : 385

```

GH65 N-terminal <

ANID\_09340 381 : YVNPFTGKLPDDDDNIINSATIAVANTYYLLQNTVVGKNAIRAQ-DAPLVNVSFSVGGGLVSDSYAGLVFWDADVWVMPGLVASHPEAAQAVTNYRRTKLYPO : 479  
ATEG\_07476 384 : FTDPSTGRLPDDDDHIINSAVIAVANTYYLLQNTVVGQNALAAVSADAPLNAQSIAVGGGLTSDSYAGLIFWDADVWVMPGLGGLAPRGRAGRHLPRRETRP : 483  
AFL2G\_0808 383 : FTDPSTGKLPEDQHVIVDSAVIAVTNIYYLLQNTVVSQNAIAAAS-NATVNETSFSVGGGLTSDSYGGQVFWADADVWVMPGLVASHPEAAQGVNTYRVAKYQQ : 481  
Afu3g02280 383 : FVDPATGKLPDDDDHILNSQIIAVANTYYLLQNTVVGKNAIKAVS-GAPVNVDSISVGGGLTSDSYAGLVFWDADVWVMPGLVASHPEAAQRVTNYRRTKLYPO : 481  
ANIR\_11020 384 : FTDPATGKLPEDSHIVDSAVIAVTNTYYLLQNTAGTNAIVAAG-GIPVNVDSICAPGGGLTSDSYGGQIFWDADLWVMPGLVASHPEAAQRTNYRIALHYQ : 482  
AO09012000 383 : FTDPSTGKLPEDQHVIVDSAVIAVTNIYYLLQNTVVSQNAIAAAS-NATVNETSFSVGGGLTSDSYGGQVFWADADVWVMPGLVASHPEAAQGVNTYRVAKYQQ : 481  
NFIA\_00344 383 : FVDPATGKLPDDEHILNSQIIAVANTYYLLQNTVVGKNAIKAVS-GAPVNVDSISVGGGLTSDSYAGLVFWDADVWVMPGLVASHPEAAQGVNTYRRTKLYPO : 481  
ACLA\_06201 385 : FVDPVTGKLPDDEHIVNSQVIAVANTYYLLQNTVVGKNATTAVS-DAPVNVDSISVGGGLTSDSYAGQVFWADADVWVMPGLVASHPEAAQRITNFRVVKYQQ : 483  
UREG\_02543 384 : FSSPESGWLPTDDHIIESAITAVANPYLLQNTVVSANAMKAVN-YAPINRGSMVGGGLTSDSYAGLVFWDADIWVMPGLVAFVAFPEAAQFTTHYRVVKYQQ : 482  
FOXG\_14683 349 : YAFPENDTLPDDEYIIDSATIAVTNTYYLLQNTVVGKSAQKAVS-GAPVNVDSISVGGGLTSDSYAGLIFWDADLWVMPGLITTSHPPEAAQRITNYRVAKYDQ : 447  
TreaAcMaE6 386 : YADPDNGTLPDQSYIIDSATIAVANTYYLLQNTVVGPNAAQSLVK-DAPVNVDSISVGGGLVSDSYAGLIFWDADLWVMPGLVWSHPQSAERITNYRVNKYGO : 484

> GH65 central

ANID\_09340 480 : AKKNIEITTYTGSKNATYIDPSAAIYPWTSGRFGNCTGTGACWDYQYHLNGDIGLSLTYQWVSGDNTNTFREKHFPIYDSVAAL--YGSIVERNGSSWTLT : 577  
ATEG\_07476 484 : GRRQHRHCLRQFQEPDALRPRRHLVVDQALRQLHCRALLGLP--VPSEGRHRAVDDLDPVGGGERGY---AGLP-RDHVPGLRLHRDAVQPPGGAQRV-- : 576  
AFL2G\_0808 482 : AKENVKTAFTSSKNQTRFDPSAAIYPWTSGRAGNCTATGACFDYQYHLNGDIGLSMIYQWVASGDTTEYFQEKHFPIYDSVATL--YSNLVERNGSSWTLT : 579  
Afu3g02280 482 : ALENINTAFTSSKNRTTFSPSAAIYPWTSGRFGNCTGTGPCWDYQYHLNGDIGLSLMIYQWIASGDTKTFREQHFPIYDSVATM--YSNIVORNGSSWTLT : 579  
ANIR\_11020 483 : AQANIEAFTTSGKNQTSFSSAAIYPWTSGRFGNCTATGPCWDYQYHLNGDIGLAMINQWVASGDTAWFKNYLPIYDAAATL--YSELVERNGSSWTLT : 580  
AO09012000 482 : AKENVKTAFTSSKNQTRFDPSAAIYPWTSGRAGNCTATGACFDYQYHLNGDIGLSMIYQWVASGDTTEYFQEKHFPIYDSVATL--YSNLVERNGSSWTLT : 579  
NFIA\_00344 482 : ALENINTAFASKNQTSFSPSAAIYPWTSGRFGNCTGTGPCWDYQYHLNGDIGLSLMIYQWIASGDTKTFREQHFPIYDSVATL--YSNIVORNGSSWTLT : 579  
ACLA\_06201 484 : ALENVNTAFTGSKNQTSFSPSAAIYPWTSGRFGNCTGTGPCWDYQYHLNGDIGLSLMIYQWITSGDTKVFREQHFPIYDSIATL--YSNLVERNGSSWTLT : 581  
UREG\_02543 483 : ALENTKTAFASSKNRTYFSPESAIYPWTSGRFGNCTGSGPCFDYQYHLNGDIGLQLINNVTITGDIRNFKSSLYPVYNSVASM--FADILERNKSSWTLT : 580  
FOXG\_14683 448 : AKKNIAATSFAGSQNKTKFSESAAYVPWTSGRFGNCTATGPCWDYQYHLNGDIGISLVNQWVTSGDTDFFKETLLPIYDSVANL--FADLLKPNKSSWTLT : 545  
TreaAcMaE6 485 : AKANAQTSYTSQNKTVFSKDAAAFVWTSGRFGNCTATGPCWDYQYHLNGDIGISFVNQLVATGDIRYFNEISLFPVYDSIATL--FSNLLAPNGSSWTLT : 582

ANID\_09340 578 : NMTDPDEYANHIDAGGFTMPMISETLEYANQFRQFQGLEPNETWTEISENVLVIREN--GVTLEYTTMNGTAVVKQADIVLVITYPLVYDN--YTAETALT : 673  
ATEG\_07476 577 : -VLDAAHQH----DRPG-----RTLRYANTFREQFLEANETWTEIADNVLVIREN--GVTLEYTTMNGTAVVKQADIVLVITYPLVYD--NYTTODALN : 660  
AFL2G\_0808 580 : NMTDPDEYANHVDAGGFTMPLIAQTLENANTFRQFNLEPNDTWTEISENVLLRQEN--NVTLEYTSMNGTAVVKQADVLLVITYPLAYES--NYTAEMALS : 676  
Afu3g02280 580 : NMTDPDEYANHIDAGGFTMPLISETLSYANSFRKQFQGLEQNETWTEISENVLLIREN--GVTLEYTTMNGTAVVKQADIVLVITYPLVYDN--NYTAQHALN : 676  
ANIR\_11020 581 : NMTDPDEYANSINAGGYTmplIAETLQANAKLRKQFQGLEPNETWTEIAEDVLIREN--GVTLEYTSMNGSAVVKQADIVLNTFFPLTYESDNYTATNSLT : 678  
AO09012000 580 : NMTDPDEYANHVDAGGFTMPLIAQTLENANTFRQFNLEPNDTWTEISENVLLRQEN--NVTLEYTSMNGTAVVKQADVLLVITYPLAYES--NYTAEMALS : 676  
NFIA\_00344 580 : NMTDPDEYANHIDAGGFTMPLISETLSYANSFRKQFQGLEQNETWTEISENVLVIREN--GVTLEYTTMNGTAVVKQADVLLVITYPLVYDN--NYTAQHALN : 676  
ACLA\_06201 582 : NMTDPDEYANHIDAGGFTMPLISETLGYANTFRKQFQHEQNETWTKIAENVLVIREN--DVTLEYTTMNGTAVVKQADVLLVITYPLVYDN--NYTSEYSLN : 678  
UREG\_02543 581 : NMTDPDEFANGVDGGGYTMPMIATTLIYANGFRQMLGLEQNETWINDMAENVLVSRDSDSGITLEYTTMNGSTHVVKQADIVLNTFFPLRYTE--NYSPENALL : 679  
FOXG\_14683 546 : NMTDPDEYANHIDAGGFTMALASETLIQANQIRRFQGMTENKTQDEIASDVLVIREN--GITLEFTTMNGSAIVVKQADVLLMSFPLGY--NDNYTDONGLD : 642  
TreaAcMaE6 583 : NMTDPDEYANHVDAGGYTmplIAETLQANTFRQFQGLEKNATWDSMATNVLVIREN--GVTLEFTTMNGSAVVKQADVLLNTFFPLSYTT--NYTTQESLN : 679

ANID\_09340 674 : DLDYYANKQSPDGPAMTWAIFSIAGAVSPSGCSAYTYHQYSYAPYARAPFFQQLSEQMLDNASINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPDDAI : 773  
ATEG\_07476 661 : DLDYYANKQSPDGPAMTWAIFSIIVATDLSPSGCSAYTYHQYATAYDPYMRAPFFQQLSEQMVNDATINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPDDIL : 760  
AFL2G\_0808 677 : DLDYYANKQSPDGPAMTWAIFSIIVASDVSPSGCSAWTYHQYSYDPYTRGPPFFQQLSEQMLDNASINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPEEGI : 776  
Afu3g02280 677 : DLDYYANKQSPDGPAMTWAIFAITANDVSPSGCSAYTYHQYSYDPYMRAPFFQQLSEQMIDDAINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPDDAI : 776  
ANIR\_11020 679 : DLDYYANKQSPDGPAMTYAIFAIVASDVSPSGCSAYTYHQYSYAPYARAPFFQQLSEQMIDDAINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVALYGYLGLRLLHPDDTI : 778  
AO09012000 677 : DLDY----QSADGPAMTWAIFSIIVASDVSPSGCSAWTYHQYSYDPYTRGPPFFQQLSEQMLDNASINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPEEGI : 772  
NFIA\_00344 677 : DLDYYANKQSPDGPAMTWAIFAITANDVSPSGCSAYTYHQYSYDPYMRAPFFQQLSEQMIDDTISINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPDDAI : 776  
ACLA\_06201 679 : DLDYFANKQSPDGPAMTWAIFAITANDVSPSGCSAYTYHQYSYDPYMRAPFFQQLSEQTIIDDAINGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPDDAI : 778  
UREG\_02543 680 : DLDYYAGKQSPNGPAMTYAIFSIIVANEVSPSGCSAYTYAQYSYDPYVRAPFFQQLSEQLVDSWLTNGGTHPAYPFLTGHHGANQVVLFGYLGLRLLPDVVL : 779  
FOXG\_14683 643 : DLDYYANKQSPDGPAMTYAIFSIIVADELSPSGCSAYTYQYSYKPYTRPPFFQQLSEQLVDNATVNGGTHPAYPFLTGHHGANQVTFYGYLGLRLLFPDQGL : 742  
TreaAcMaE6 680 : DLDY----SPDGPAMTWAFFSIIANDISPSGCSAYTYSQYSYKPYARAPFFQQLSEQLIDNATINGGTHPAYPFLTGHHGANQVNVFGYLGLRLLPDDAI : 774

YANKQ (predição Augustus)

GH65 central <

ANID\_09340 774 : HIEPNLPPQIPYVKYRTFYWRGWPISAQSNYTHTVLQRSQS-APLDTADRRFANTSIPVVFVGLA----DNATLHHLPPHGPLTVRNRREIGTINTIEDNLI : 868  
ATEG\_07476 761 : HIDPNLPPQLPHIQYRTFYWRGWPAAARSNATHTLARA-DLDPLDTADMRFANASIAVHVGFETNGTSEAS-YELPATGELTVPNGRIGWIPTTDGNMA : 858  
AFL2G\_0808 777 : YITPNLPPQIPYVKYRTFYWRGWPAAAESNYTHTIIRRDTKTAPLSTADERFRNATIPVHVGSDF---EAETHLQPTGSPLIENRQIGTIPTMQGNQI : 872  
Afu3q02280 777 : HIDPNLPPQVSNLKYRTFYWRGWPISSSSNRTHTTISRANLAPLDTADSRFANASIPVVLVGDPI---SNSTAYRLPVTAPLVVPPNRQIGFNNTIPGNMV : 872  
ANIR\_11020 779 : YIDPNLPPQIPHITIRTYRTHYWHGWPISAWSNYTHTIKRDSLLAPLASADLLFSNVSIKVVQVQSTASADEATIYYLPLSGELTVPNRMIGSVNTTPGNQV : 878  
AO09012000 773 : YITPNLPPQIPYVKYRTFYWRGWPAAAESNYTHTIIRRDTKTAPLSTADERFRNATIPVHVGSDF---EAETHLQPTGSPLIENRQIGTIPTMQGNQI : 868  
NFIA\_00344 777 : HIDPNLPPQVSNVYRTFYWRGWPISSSSNRTHTTISRANLAPLDTADSRFANASIPVVLVGDPI---SNSTAYRLPATGPLVVPNRQIGFNNTIPGNMV : 872  
ACLA\_06201 779 : HIDPNLPPQIPNVAYRTFYWHGWPISASSNRTHTTISRATKIAPLDTADPRFANASIPVVLVGYD---TNAIYAYHLPSPGPLTVRNRQIGLNNTIPGNII : 874  
UREG\_02543 780 : HLDPNLPPQIPHITIRTYRTHYWHGWP LKARSNYTHTIQRAQDRDALQIADQRFANAPIPVHVGVPEV---NVKVYSLPVTGELVIPNRQIGSINTYPCNLV : 875  
FOXG\_14683 743 : HVNPNLPPQIPYLKYRTFYWRGWPISAWSNYTHTTISRHPHTTKPLDQVADSRYANKGIYAVYAGKM---GDSALHHLTFDEPVVVIKNRQIGSVNTVHGSLA : 838  
TreaAcMaE6 775 : HINPNLPPQLSHLRYRTFYWRGWPFAASSNATHTTVRRARHVRPLPSADPRFANATITLDAGAD---GNATAYHLPVDGAAVVPNRNIGRINTTPGNLI : 870

> **G65 C-terminal** <

ANID\_09340 869 : QCPVSVSTDAFEQGFPIISVVDGATSTRWQPS-SSNASAVTVNLGSTTGRSVQTVASGFHFDWAAAPPVNASVIFHDTPLSDPVAALS-----SP-G- : 958  
ATEG\_07476 859 : QCLPVASRDAYAPGFPIIAVVDGATSTRWQPA-SSKISAVTVDLGRGA-AVAGANVTAFFHFDWAAMPVNAVTVFHDVPLRDPAAVAA-----GAHEG : 949  
AFL2G\_0808 873 : QCQPITSPDEHKAGQFPIISANDGATSTKWQPA-SSNLSSITVTLSDT---QLANAVSGFHFDWASAPPVNASVIFHEEVIDNPASVFAFGTQDQAQEGD : 968  
Afu3q02280 873 : QCRPVYSPNDYAPGFPIIAAVDVGATSTKWQPS-TANMSSLTVALADV---EINSKVSGFHFNWQAPPVNAVTVIFHDEMLEDPVAAMS-----SSHGN : 961  
ANIR\_11020 879 : QCHPVYSPDAYEPGFPIISAVDVGATSTKWQPS-TSDLTSLTVTLSTTAEAGAEV-VSGFYFDWSQAPPENLIVIFHDSPIGNPSTVFA-----AAGSNS : 970  
AO09012000 869 : QCQPITSPDEYKAGQFPIISANDGATSTKWQPA-SSNLSSITVTLSDT---QLANAVSGFHFDWASAPPVNASVIFHEEVIDNPASVFAFGTQDQAQEGD : 964  
NFIA\_00344 873 : QCRPVYSPNDYAPGFPIIAAVDVGATSTKWQPS-TANMSSLTVALADI---EINSKVSGFHFNWQAPPVNAVTVIFHDEMLEDPVAAMS-----SAHGN : 961  
ACLA\_06201 875 : QCRPVYSPDDYAPGFPIIAAVDVGATSTKWQPA-TTNTSALTVTLPDA---EVNSVSGFHFDWQAPPVNAVTVIFHDETLEDPVTALS-----SSHGN : 963  
UREG\_02543 876 : QCQPVSSPNEYLPGFPIIAADIGAASTKWQPKSANVTASITVTFPES---ALSSRIVGFQFDWAQAPPQYAKVLLHDAPIP-PVANI-----SSSGP : 963  
FOXG\_14683 839 : QCRPVKSSNSYEPGFPIIAAVDVGATSTKWQPSKAAEVSSLTVSLAKK---DVGSKVKGFYFDWADAPPINVTVLFHNKTIIDDP TKVYG-----TSSHD : 928  
TreaAcMaE6 871 : QCRSADSPGAHRPGQFPIIGAVDVGATSTKWQPYAANLSAVTVMLAPD---DVGAMVSGLHFNWQAPPVNAVTVFHNATIASFADV-----DVSQAQKKG : 961

ANID\_09340 959 : PHVRIIVANLNLNIEQSGPYDP-EATDLNFKIPVGNTRFELAQEVPVGRYATLVIISGNOALAQAD--GEDHV GATVAEWAAILGPK--SGSP-----RR- : 1046  
ATEG\_07476 950 : GDYRVVATLIDIAQSKPYRA-DSEFTAVAVPVGNTTDRIDAPVQAARYATLLISGNOGLAA---GEDV GATVAEWAAILSPAMQTHAQRRSGRARS : 1044  
AFL2G\_0808 969 : EKRYVVLTLTGIEPSTIYTA-E--EENQVRIPVGNNTTTLQKETS VKASKYATLLIAGNOALS--G--EQEDA GATVAEWAAILSQE--GGQSQAATAQR- : 1058  
Afu3q02280 962 : SRYRVVTLTLNIEQSQPYDA-QSTDNNEVVLNTGNTTDSVLSQTVHTSRMATLLISGNOA---G--GEE--GATVAEWAAILGES--KGSSSGHGNNKR- : 1049  
ANIR\_11020 965 : EKRYVVLTLTGIEPSTIYTA-E--EENQVRIPVGNNTTTLQKETS VKASKYATLLIAGNOALS--G--EQEDA GATVAEWAAILSQE--GGQSQAATAQR- : 1054  
NFIA\_00344 962 : SRYRVVTLTLNIEQSQPYNA-QSPDYNEVVMATGNTTDSVLSQTVHTSRMATLLISGNOA---G--GEE--GATVAEWAAILGES--KGSSSGHGNNKR- : 1049  
ACLA\_06201 964 : PQTIVITTLNIELSOPYNA-ESSDLNKVAMPTGNTTDSVLSQTVHTSRMATLLIAGNOALS--G--GEE--GATVAEWAAILGQE--KSS-GHDNGKR- : 1050  
UREG\_02543 964 : AGSIVAAELSLIIMSDFYRP-NITDLNEVVPYKNTTNTLSSPVPVTKFATLLISGNOALGEVEIRAGNGT GATVAEWAAILGSDSAQONKRGE GELKRF : 1062  
FOXG\_14683 929 : SGYDVVVSIKVKLSDAYNA-KTDNLDVAVVPTGNTTNTLPEPVPLSRCATLLIAGNOALDKVDLKAGNGT GATVAEWAAIL----- : 1009  
TreaAcMaE6 962 : ABEYVVTHTLACVPLSNPYSV-QATNLDAIAPVGNNTNVTLQAVPAARYATLLIAGNOALGQRDVKDNGT GATVAEWAAILSDRRKMDGEAAPAKMR- : 1059

ANID\_09340 1047 : --R---IQPVPL----- : 1054  
ATEG\_07476 1045 : DMLDRTMLRGRIGK----- : 1058  
AFL2G\_0808 1059 : --RGMNVRDRALLE-----RLRR----- : 1074  
Afu3q02280 1050 : --R-LDVRAAAALSA-LNDRRYRQFNA----- : 1072  
ANIR\_11020 1059 : --K-MSARSKATL-----AQLSTACLLSYETFASVSVSYHIWIRSTLINCY- : 1101  
AO09012000 1055 : --RGMNVRDRALLE-----RLRR----- : 1070  
NFIA\_00344 1050 : --R-LDVRAAAALSGGLNDRRYRQFNA----- : 1073  
ACLA\_06201 1051 : --R-LDVRSAAALSGSLDDRRARRFTA----- : 1074  
UREG\_02543 1063 : RIRGVTWRDAAENRRV----- : 1078  
FOXG\_14683 1010 : -----H : 1010  
TreaAcMaE6 1060 : --RSLTWREEGMLMGRPY----- : 1075

**Figura 10. Comparação entre sequência de aminoácidos de trealases ácidas de fungos.** Alinhamento realizado no programa GeneDoc utilizando as sequências protéicas de fungos filamentosos extraídas do banco de dados do BROAD Institute e a sequência predita de *M. anisopliae* E6 (TreaAcMaE6). O nome das sequências compreende uma abreviatura do organismo e o número de acesso do banco de dados. ANID – *Aspergillus nidulans*, ATEG – *A. terreus*, AFL2G – *A. flavus*, Afu3g – *A. fumigatus*, NFIA – *A. fischeri*, ACLA – *A. clavatus*, AO – *A. oryzae*, ANIR – *A. niger*, UREG – *Uncinocarpus reesii*, FOXG – *Fusarium oxysporum*. Os números ao lado das sequências representam a posição dos aminoácidos nas proteínas preditas. As regiões em fundo preto indicam identidade entre os aminoácidos em determinada posição (100% de conservação dos resíduos). As regiões em fundo cinza escuro indicam regiões com no mínimo 80% de conservação e as regiões em fundo cinza claro indicam regiões com no mínimo 60% de conservação entre os resíduos de aminoácidos. O início (>) e o término (<) dos domínios GH65 N-terminal, Central e C-terminal estão indicados embaixo do alinhamento.

A próxima etapa na construção de uma linhagem de *M. anisopliae* que expresse uma toxina recombinante envolverá a construção de vetores que contém a região promotora (PTrea) e o peptídeo sinal (PS) presentes no gene da trealase ácida. Está em andamento a construção dos vetores PTreaPS::JAB::BAR e PTreaPS::GFP::BAR. Primeiramente, será realizada a construção que avalia a expressão de GFP governado por este promotor para estudos de regulação. Estas construções permitirão a expressão de toxinas fusionadas a um peptídeo sinal de exportação celular e sob regulação do promotor da trealase ácida, o qual é induzido por trealose, o principal açúcar presente na hemolinfa de insetos.

### 3.5. PERSPECTIVAS

- Realizar a construção de vetores para permitir a expressão de proteínas de interesse sob regulação do promotor e do peptídeo sinal contidos no gene da trealase ácida de *M. anisopliae*.
- Reavaliar a expressão do peptídeo Jaburetox-2Ec nas linhagens transformantes de *M. anisopliae* por *Western blot* sem utilizar tratamentos que possam estar levando a formação de agregados (liofilização, refrigeração ou congelamento da amostra).
- Caso a expressão do peptídeo Jaburetox-2Ec em *M. anisopliae* não forme agregados, realizar bioensaios contra hospedeiros a serem determinados.
- Como alternativa, utilizar a toxina da aranha *Brachypelma ruhnaui*, cedida pelo Prof. Bergman Morais Ribeiro do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia (UnB).

## 4. CAPÍTULO 2

Avaliação em Escala Genômica das Quitinases de *Metarhizium anisopliae*.

### 4.1. INTRODUÇÃO

#### 4.1.1. Quitinases de Fungos:

A quitina ( $C_8H_{13}O_5N$ )<sub>n</sub> é um homopolímero linear composto de unidades de N-acetilglicosamina, ligadas por ligações β-1-4, arranjada em microfibrilas de configuração antiparalela (α), paralela (β) ou mista (γ) (DAHIYA *et al.*, 2005). As N-acetilglicosaminas são monossacarídeos derivados da glicose que contém um grupo acetamido ligado ao carbono 2. A quitina é o principal componente da parede celular dos fungos e está presente também no exoesqueleto dos artrópodes (principalmente insetos e crustáceos), onde confere defesa mecânica e suporte corporal. É uma fonte renovável abundante, podendo ser extraída também de derivados marinhos, os quais podem ser processados e utilizados em produtos comerciais (ADAMS, 2004; DUO-CHUAN, 2006). A hidrólise enzimática completa da quitina à N-acetilglicosamina livre é realizada por um sistema quitinolítico, o qual atua de maneira sinérgica e consecutiva (PATIL *et al.*, 2000).

As quitinases (E.C. 3.2.1.14) são enzimas que hidrolisam as ligações β-1-4 existentes entre as subunidades de N-acetilglicosaminas. Elas são divididas em duas classes principais, as endoquitinases e as exoquitinases. As endoquitinases clivam a quitina em sítios aleatórios no interior do polímero liberando quito-oligossacarídeos (quitotetraose, quitotriose). As exoquitinases podem clivar a quitina a partir da sua extremidade não-redutora, liberando dímeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc)<sub>2</sub> (DUO-CHUAN, 2006; VAN AALTEN *et al.*, 2001). Já foram descritas também as endo-exoquitinases, que possuem as duas atividades (DA SILVA *et al.*, 2005). Ambas as classes de quitinases são distintas das N-acetilglicosaminidases (E.C. 3.2.1.52) que atuam primordialmente sobre os produtos da ação das quitinases, e os convertem em monossacarídeos, as N-acetilglicosaminas. No entanto, as N-acetilglicosaminidases também são capazes de liberar

resíduos de N-acetilglicosamina a partir da extremidade não redutora da quitina, mas com menor afinidade do que pelo dímero de diacetilquitobiose (GlcNAc)<sub>2</sub>, e por isso são classificadas por alguns autores também como exoquitinases (DUO-CHUAN, 2006; ). De acordo com a classificação do banco de dados CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes database*) as N-acetilglicosaminidases pertencem a família 20 das glicosil hidrolases.

As quitinases foram classificadas em duas famílias, as famílias 18 e 19 das glicosil hidrolases com base na conservação das sequências de aminoácidos, na presença de vários motivos conservados e na estrutura de proteínas (HENRISSAT, 1991). A família 18 é amplamente distribuída em representantes de todos os reinos, incluindo vírus, bactérias, plantas, fungos e animais (PERRAKIS *et al.*, 1994; HAWTIN *et al.*, 1995; TERWISSCHA *et al.*, 1996; SAITO *et al.*, 1999; HOLHS *et al.*, 2000). As quitinases da família 19 são encontradas na sua maioria em plantas (TRUONG *et al.*, 2003), mas há relatos de quitinases da família 19 presentes também em bactérias (OHNO *et al.*, 1996; UEDA *et al.*, 2003), vírus (HONDA *et al.*, 2008) e nematóides (The *C. elegans* Sequencing Consortium *et al.*, 1998; GENG *et al.*, 2002).

Estas duas famílias não compartilham similaridade de sequência e apresentam diferentes estruturas tridimensionais: a família 18 tem um domínio catalítico em forma de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, enquanto a família 19 apresenta uma estrutura bilobada e é predominantemente composta de  $\alpha$ -hélices. Elas também diferem no seu mecanismo enzimático: as quitinases da família 18 possuem um mecanismo de retenção, o qual resulta em quito-oligossacarídeos com configuração  $\beta$ -anomérica, enquanto as quitinases da família 19 têm um mecanismo de inversão e conseqüentemente seus produtos são  $\alpha$ -anômeros (DAVIES & HENRISSAT, 1995). Outra diferença é a sensibilidade a alosamidina, a qual inibe apenas as quitinases da família 18 (SAKUDA *et al.*, 1986).

Todas as quitinases de fungos descritas até então pertencem à família 18 das glicosil hidrolases. A composição de domínios encontrados nas quitinases foi utilizada para classificá-las em subgrupos. Os subgrupos A, B e C foram utilizados para separar as 18 quitinases encontradas através de análise genômica de *Hypocrea jecorina* (anamorfo: *Trichoderma reesei*) (SEIDL *et al.*, 2005 e 2008). Dentre os diferentes domínios já detectados nas quitinases estão: domínio catalítico e característico das quitinases da família 18 (GH18); uma região rica em resíduos de serina/treonina; domínio de ligação à quitina

(ChBD); domínio de ligação a celulose (CBD), domínios LysM e região N-terminal contendo peptídeo sinal.

As quitinases dos subgrupos A e B compreendem todas as quitinases fúngicas já estudadas. O subgrupo C é um grupo novo, contendo quitinases de alta massa molecular, que possuem domínios LysM e que ainda não foram isoladas e caracterizadas (SEIDL *et al.*, 2005).

Em concordância com a sua ampla distribuição, as quitinases assumem funções diversas nos organismos em que estão presentes. Nos insetos as quitinases participam da renovação da cutícula, auxiliando na dissolução e substituição da carapaça quitinosa antiga (MERZENDORFER & ZIMMICH, 2003). Nos humanos, as quitinases parecem estar relacionadas à patologia da asma e também atuar na defesa contra patógenos fúngicos e em outros vertebrados as quitinases estão presentes no trato digestivo (ZHU *et al.*, 2004; KRYKBAEV *et al.*, 2010). As quitinases de plantas são grupos bem caracterizados e atuam na defesa contra fungos fitopatogênicos, resposta a estresse e desenvolvimento (KASPRZEWSKA, 2003).

Algumas das funções potenciais já sugeridas para as quitinases de fungos incluem: (i) a degradação da quitina exógena (presente em fragmentos de hifas autolizadas e no exoesqueleto dos artrópodes mortos) para uso como fonte de nutriente, (ii) remodelamento da parede celular durante o ciclo de vida do fungo (crescimento das hifas, ramificações, fusão de hifas e autólise) e (iii) competição e defesa contra outros fungos ou artrópodes no habitat, e a participação das quitinases como fatores de virulência em fungos mico e entomopatogênicos (SEIDL, 2008; BOLDO *et al.*, 2009). Apesar do número de quitinases já isoladas ou descritas em fungos leveduriformes e filamentosos ser amplo (DUO-CHUAN, 2006), estudos envolvendo a descrição exata da função dessas quitinases ainda são escassos. Poucos trabalhos observaram alterações fenotípicas em mutantes deletados para quitinases. Muitos dos estudos que tem por objetivo analisar a função dos genes de quitinases descrevem alterações nos níveis de transcritos ou na atividade de quitinases secretadas frente a cultivos com diferentes condições, como por exemplo, em diferentes fontes de carbono (quitina coloidal, glicose, N-acetilglicosamina, entre outras) ou que mimetizam infecção (carapaça ou hemolinfa de insetos, parede celular de outros fungos). Alguns dos genes de quitinases estudados estão descritos a seguir.

A ampla diversidade de tipos celulares apresentada pelos fungos durante o seu ciclo de vida requer a atuação combinada de enzimas que promovam o remodelamento adequando da parede celular. Em leveduras, o estudo dos genes que codificam quitinases demonstrou que estas enzimas estão envolvidas em alterações morfológicas, já que mutantes para os genes de quitinase apresentaram estruturas anormais. A quitinase CTS1 de *Saccharomyces cerevisiae* está envolvida na separação celular das células mãe e filha após divisão e na esporulação (KURANDA & ROBBINS, 1991). As quitinases CHT2 e CHT3 de *Candida albicans* e KICtsp1 de *Kluyveromyces lactis* também apresentam defeitos na separação celular em mutantes para os respectivos genes (McCREATH *et al.*, 1996; DUNKLER *et al.*, 2005; COLUSSI *et al.*, 2005).

As quitinases são produzidas durante todos os estágios de crescimento ativo dos fungos; durante a germinação dos esporos, no crescimento exponencial e no desenvolvimento do micélio (GOODAY *et al.*, 1992). As paredes cilíndricas das hifas, ao contrário do seu ápice, são estruturas rígidas. As microfibrilas de quitina são maiores, mais cristalinas e apresentam ligações cruzadas (covalentes e não-covalentes) com outros componentes da parede celular ( $\beta$ -glicanas). A parede apical é plástica, formada por polímeros que ainda não apresentam ligações cruzadas entre si, e que se torna progressivamente rígida pelas ligações entre seus polímeros (WESSELS, 1993). Tanto o local da germinação do esporo quanto os sítios de uma nova ramificação nas paredes rígidas das hifas precisam ser “fragilizados” para permitir a formação de um novo ápice, e as enzimas líticas são componentes óbvios neste processo. A formação de ramificações está associada com o acúmulo localizado de hidrolases, como as quitinases, glicanases e transglicosilases. A quitinase ChiA de *A. nidulans* é uma proteína ancorada a GPI, glicosilada e está localizada nos sítios de germinação do conídio, nas regiões de ramificações das hifas, nos septos e também no ápice das hifas. Desta maneira, esta proteína pode ser responsável pelo remodelamento da parede celular quitinosa rígida para uma estrutura mais frouxa nos sítios de germinação do conídio e nas regiões de ramificação das hifas (YAMAZAKI *et al.*, 2008).

Foi demonstrado que a quitinase ChiB de *A. nidulans* está envolvida na autólise deste fungo. A autólise pode ser descrita como um processo natural de auto-degradação das células (SHIN *et al.*, 2009). Este processo é observado em fungos filamentosos em estágios avançados de cultivo, quando pode ser observado um aumento substancial na atividade de

enzimas líticas, principalmente carbohidrolases. A deleção do gene *ChiB* causou uma menor eficiência na lise das hifas em estágios avançados de cultivo. A proteína ChiB foi altamente induzida em condição de privação de fontes de carbono (YAMAZAKI *et al.*, 2006). Em mutantes  $\Delta flbA$  (caracterizados por intensa autólise) a deleção do gene *chiB* (gerando o mutante duplo  $\Delta flbA\Delta chiB$ ) resultou em ausência de sinais de autólise em cultivo de *A. nidulans* submerso por até 8h. Em cultivos de placas com exposição ao ar, o mutante duplo apresentou autólise apenas parcial, ao contrário da intensa autólise observada no mutante único para *flbA* (SHIN *et al.*, 2009).

Inúmeras quitinases de fungos micopatógenos foram caracterizadas e atuam na degradação da parede celular de fungos fitopatógenos. Em diferentes espécies de micopatógenos do gênero *Trichoderma*, já foram caracterizadas quitinases que atuam sobre a parede celular de outros fungos. Carsolio *et al.* (1994) observou que a expressão do gene *ech42* de *T. harzianum* foi fortemente aumentada durante interação com fungo fitopatogênico *in vitro*. A expressão do gene *ech30*, em *T. atroviride*, foi induzida na presença de *B. cinerea* em ensaios de confronto em placas (KLEMSDAL *et al.*, 2006). Além disso, transcritos dos genes *chi18-10* e *chi18-13* foram altamente expressos em *T. atroviridis* quando cultivados com parede celular e em ensaios de confronto com o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (SEIDL, 2005).

Além da quitinase de *Trichoderma*, aquela codificada pelo gene *chi46* de *Chaetomium globosum* apresentou atividade contra fragmentos da parede celular em ensaios de confronto contra oomycetos. Este gene apresentou altos níveis de transcritos expressos (um aumento de 306,5 vezes) após tratamento com partes da parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIU *et al.*, 2008). Da mesma forma, o gene da endoquitinase *sechi44* de *Stachybotrys elegans* foi induzido por fragmentos da parede celular de *R. solani*. Transcritos deste gene demonstraram um aumento de 500 vezes no seu nível de expressão após 48 do tratamento (MORISSETTE *et al.*, 2006).

Em relação aos entomopatógenos, foram estudadas quitinases de *B. bassiana*, *Nomuraea rileyi* (WATTANALAI *et al.*, 2004), e *Paecilomyces javanicus* (CHEN *et al.*, 2007), além daquelas de *M. anisopliae*. O gene *Bbchit1* de *B. bassiana* foi superexpresso e as linhagens resultantes apresentaram maior virulência em bioensaios contra afídeos adultos (*Myzus persicae*) (FANG *et al.*, 2004). Utilizando este mesmo gene, Fan *et al.* (2007), construíram e superexpressaram em *B. bassiana* uma quitinase recombinante

contendo um domínio de ligação à quitina pertencente ao inseto *Bombix mori*. Essa quitinase recombinante apresentou não somente propriedades cinéticas de hidrólise de quitina aumentadas como também maior virulência em comparação com a quitinase nativa expressa constitutivamente. Em *K. lactis*, uma das três subunidades de uma toxina *killer* apresenta atividade de quitinase (BUTLER *et al.*, 1991).

Os fungos apresentam entre 10 e 25 quitinases diferentes, e apenas o aumento do número de projetos de sequenciamento dos genomas destes organismos nos últimos anos possibilitou a descoberta desta grande diversidade de quitinases (SEIDL, 2008). A maioria das quitinases nestes organismos ainda não foi estudada isoladamente. Muitas quitinases putativas ainda precisam ter sua função determinada. Como pode ser observado na tabela a seguir, análises genômicas revelaram a presença de várias ORFS codificando putativas quitinases em fungos.

**Tabela 4. Número de quitinases preditas nos genomas de fungos.**

<b>Organismo</b>	<b>No. de quitinases putativas</b>	<b>Referência</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	BROAD Institute
<i>Chaetomium globosum</i>	15	LIU <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> R265	4	BROAD Institute
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	4	BROAD Institute
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01 e 18	5	BROAD Institute
<i>Histoplasma capsulatum</i> NAm1	10	BROAD Institute
<i>Hypocrea jecorina</i>	18	SEIDL <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC4	19	BROAD Institute
<i>Aspergillus fumigatus</i>	18	BROAD Institute
<i>Fusarium oxysporum</i>	25	BROAD Institute
<i>Magnaporthe grisea</i>	15	BROAD Institute

#### 4.1.2. Quitinases de *M. anisopliae*

A primeira quitinase de *M. anisopliae* E6 estudada foi purificada a partir de cultivos contendo quitina como única fonte de carbono. Esta quitinase extracelular foi caracterizada como uma endo-exo-quitinase, apresentou uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa e foi nomeada CHIT30 (PINTO *et al.*, 1997). O primeiro gene correspondente a uma quitinase de *M. anisopliae* foi isolado e estudado por BOGO *et al.* (1998) e nomeado *chit1*. Em sequência, outras quitinases de *M. anisopliae* foram identificadas em gel de atividade contendo glicol quitina (zimogramas), onde foram detectadas seis diferentes bandas oriundas de sobrenadantes cultivados sob condições que mimetizam o processo de infecção (DA SILVA *et al.*, 2005). Pelo menos duas quitinases de *M. anisopliae* foram detectadas ligadas a parede celular deste fungo, além da atividade quitinolítica existente no sobrenadante de cultivo deste organismo (de MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004).

Além do gene *chit1*, outros dois genes que codificam quitinases em *M. anisopliae* E6 foram isolados e caracterizados. Baratto *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram o gene *chi2*, além de detectar transcritos deste gene presentes em cultivos contendo quitina, N-acetilglicosamina e cutícula de carrapato. O gene *chi3* que codifica a quitinase CHIT30 foi isolado e a endo-exo-quitinase correspondente foi identificada em condições de infecção na cutícula do carrapato *R. microplus* por análises imunocitoquímicas. Assim como a quitinase CHI2, a quitinase CHIT30 é detectada em cultivos com as condições indutoras: quitina, cutícula de carrapato e baixas concentrações de N-acetilglicosamina. Ao contrário, cultivos em glicose e altas concentrações de N-acetilglicosamina não apresentaram níveis detectáveis da quitinase CHIT30 (DA SILVA *et al.*, 2005).

Com o objetivo de compreender melhor a função das quitinases em *M. anisopliae*, alguns mutantes para estes genes foram construídos. Em 2009, Boldo *et al.* demonstraram que linhagens que superexpressaram o gene *chi2* foram mais virulentas em comparação ao tipo selvagem frente ao hospedeiro *D. peruvianus* e, de maneira oposta, mutantes para o gene que codifica a quitinase CHI2 apresentaram virulência reduzida, o que confirma a importância desta proteína no processo de infecção. Além desta, a deleção da endo-exo-quitinase, codificada pelo gene *chi3*, demonstrou uma menor virulência em bioensaios contra

*D. peruvianus* (STAATS, 2007). Já a superexpressão de *chi3* foi letal para o fungo. Os mutantes para estes genes não apresentaram nenhuma alteração morfológica observável.

Através do estudo de outras linhagens de *M. anisopliae*, St. Leger e colaboradores também detectaram atividade de quitinase em sobrenadante de cultura contendo cutícula de gafanhoto (ST. LEGER *et al.*, 1987). Em 1991, este grupo purificou duas quitinases, uma endoquitinase de 33 kDa e uma quitobiosidade de 110 kDa a partir de meios contendo quitina como única fonte de carbono. Após análise de géis de atividade de quitinase contendo glicol quitina, foi sugerido a presença de 20 isoenzimas de quitinases na linhagem *M. anisopliae* 324 (ST. LEGER *et al.*, 1993).

Em análises genômicas de fungos filamentosos relacionados foram encontrados até 18 ORFs presentes que codificariam putativas quitinases, o que amplia a possibilidade de ainda existirem outros genes que codificam para quitinases em *M. anisopliae* ainda não isolados e estudados (DUO-CHUAN, 2006; SEIDL, 2008). Com base nestes trabalhos, é de se supor que *M. anisopliae* também apresente um número maior do que o já descrito em trabalhos anteriores.

Outro fator que acrescenta diversidade ao número de quitinases são os mecanismos de regulação pós-transcricional. Foi observada a presença de dois transcritos oriundos do mesmo gene de quitinase, o gene *chi2*. A diferença entre as duas espécies de transcrito está relacionada a retenção do segundo íntron contido neste gene. Este íntron apresenta um códon de terminação ao seu final, e quando o mesmo não é excisado, ocorre a produção de uma proteína diferente que não contém o terceiro éxon. As duas proteínas diferentes foram identificadas por espectrometria de massas (BOLDO *et al.*, 2010). A presença de duas bandas em análises de transcritos de quitinases também já havia sido detectada para os genes *chi18-3* e *chi18-13* no trabalho de Seidl *et al.* (2005). Além do aumento do número de quitinases presentes em fungos, eventos como *splicing* alternativo contribuem para a complexidade do complexo quitinolítico.

## 4.2. OBJETIVOS

Descrever as quitinases de *M. anisopliae* por análise genômica *in silico* e caracterizar as proteínas.

## 4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.3.1. Biomineração por Quitinases no Genoma de *M. anisopliae*

O pirosequenciamento do genoma de *M. anisopliae* linhagem E6, foi realizado pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), apresentando uma cobertura de 23X. A biomineração pelas quitinases foi realizada com base em *contigs* dos rascunhos até então disponíveis, já que a anotação ainda está em andamento.

A biomineração das quitinases no genoma de *M. anisopliae* E6 foi realizada utilizando as sequências selecionadas de quitinases de fungos filamentosos e de leveduras. Os organismos e as linhagens utilizadas foram: *H. jecorina* (*T. reesei*), *Magnaporthe grisea* 70-15, *A. fumigatus* Af293, *A. nidulans* FGSC A4, *Fusarium oxysporum*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99, *C. gattii* R265, *Histoplasma capsulatum* NAm1e *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 e Pb18. As sequências protéicas das quitinases destes organismos foram extraídas dos bancos de dados do NCBI e BROAD Institute (<http://www.broadinstitute.org/>). Primeiramente, as sequências de aminoácidos das quitinases de *H. jecorina* foram utilizadas para identificar as quitinases dos microrganismos previamente citados. Após, a sequência de cada quitinase identificada foi utilizada para encontrar os *contigs* de *M. anisopliae* que possuíam similaridade com as mesmas através da aplicação do algoritmo tBLASTn no software BioEdit (HALL, 1999). Os *contigs* que apresentaram sequências similares a das quitinases foram analisados para verificar a presença do domínio de quitinases da família GH18. A mesma metodologia de busca foi realizada também com 245 sequências de quitinases (EC 3.2.1.14) extraídas do banco de dados SwissProt, e também com a sequência canônica DxxDxDxE. As buscas foram realizadas de acordo com o diagrama representado na Figura 11 até a obtenção de redundância dos resultados.

Para verificar a possível presença de quitinases da família 19 das glicosil hidrolases, a sequência de aminoácidos de *Pringlea antiscorbutica* (no. Acesso NCBI: AAP94636) e de *Arabidopsis thaliana* (NP\_188317) foram utilizadas em buscas no genoma de *M. anisopliae* E6 através da ferramenta tBLASTn no programa BioEdit.

#### 4.3.2 Análise das Sequências de Quitinases Obtidas

A validação da busca por quitinases foi efetuada por comparações das sequências preditas obtidas dos *contigs* com bancos de dados públicos. Para classificar a proteína predita como quitinase, a mesma deveria apresentar as seguintes características: (i) conter o domínio característico das glicosil hidrolases da família 18 - GH18; (ii) conter as duas sequências frequentemente detectadas S/AxGG e DxxDxDxE e (iii) apresentar outros domínios característicos, como domínios de ligação à quitina (ChBD), domínio de ligação à celulose (CBD) e domínios LysM. Os domínios conservados foram analisados com a ferramenta InterProScan (ZDOBNOV & APWEILER, 2001, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) e o banco de dados de domínios conservados CDD (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2009) do NCBI. Sempre que as regiões N-terminal e C-terminal de uma provável quitinase não eram bem determinadas, uma predição da ORF era realizada pela utilização do software FGENESH 2.6 (SALAMOV & SOLOVYEV, 2000; <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>).

Também foi realizada uma identificação de possível sítio de clivagem de peptídeo-sinal para exportação e/ou sítio de ligação à GPI para cada proteína predita utilizando as ferramentas SignalP 3.0 (EMANUELSSON *et al.*, 2007; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e Big-PI Fungal Predictor (EISENHABER *et al.*, 2004; [http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)). O ponto isoelétrico e a massa molecular preditos das quitinases foram obtidos pela utilização do software Compute pI/Mw tool (BJELLQVIST *et al.*, 1993 e 1994; [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)).

#### 4.3.3 Análises Filogenéticas das Quitinases

As sequências protéicas das quitinases analisadas foram primeiramente alinhadas utilizando o programa ClustalX 2.0 (LARKIN *et al.*, 2007). Para alinhar as sequências de aminoácidos de *M. anisopliae* e de *H. jecorina* foi selecionada a matriz de substituição

BLOSUM30, com valores de abertura de gap de 9,0 e extensão de gap de 0,5, sendo que as outras condições permaneceram com a seleção padrão (*default*) do programa. As sequências de aminoácidos das quitinases corresponderam às proteínas maduras (foram excluídos os potenciais peptídeos sinal). Seguiu-se a construção de árvores filogenéticas no programa MEGA 4.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, TAMURA *et al.*, 2007), utilizando o algoritmo de distância *Neighbour Joining* (SAITOU & NEI, 1987). A estabilidade das ramificações foi avaliada por rearranjos de 1.000 *bootstraps*. A barra adicionada nas árvores filogenéticas obtidas indica a distância genética, sendo proporcional ao número de substituições de aminoácidos.

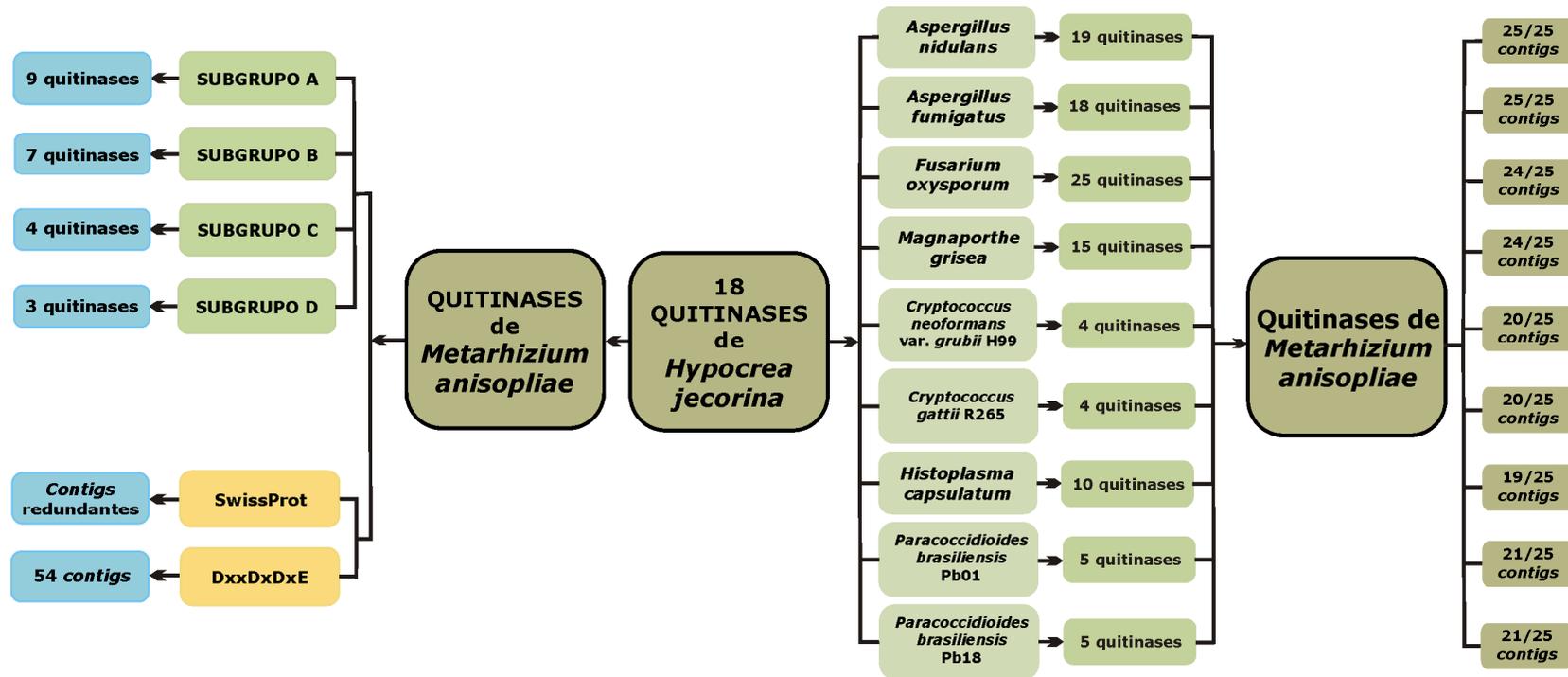
#### 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.4.1. *Biominação por Quitinases no Genoma de M. anisopliae*

Os primeiros dados gerados a partir do sequenciamento do genoma de *M. anisopliae* resultaram em dois rascunhos sequenciais, os quais possuem 5.262 e 895 *contigs* respectivamente. Deste total, as sequências de quitinases de *M. anisopliae* estavam presentes em 25 *contigs* diferentes. A primeira varredura contra os *contigs* de *M. anisopliae*, utilizando as 18 sequências de *H. jecorina*, foi suficiente para localizar os 25 *contigs*. As outras 105 sequências de quitinases dos outros nove fungos (seção 4.3.1) resultaram em alinhamentos com os mesmos *contigs* previamente localizados na primeira varredura, o que demonstra a eficácia da metodologia de busca utilizada. Além disso, as 245 sequências de quitinases extraídas do banco de dados SwissProt e utilizadas nas buscas também alinharam com os 25 *contigs*. Inúmeros outros *contigs* apresentam níveis de similaridade com as proteínas utilizadas nas buscas, no entanto, apenas estes 25 possuem o domínio das glicosil hidrolases da família 18, considerado imprescindível para a caracterização das quitinases. A redundância apresentada pela utilização de 368 quitinases (18 + 105 + 245) nas buscas aumenta a credibilidade dos resultados obtidos (Figura 11).

Analisando os 25 *contigs*, foram identificadas 23 ORFs de quitinases putativas, incluindo os três genes (*chit1*, *chi2* e *chi3*) já isolados em trabalhos anteriores realizados

pelo nosso grupo (BOGO *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2005; BARATTO *et al.*, 2006). Foi possível identificar o domínio da família 18 das glicosil hidrolases (GH18) em todos os genes preditos, através da ferramenta InterProScan.



**Figura 11. Diagrama lógico da biomineração de quitinasas no genoma de *M. anisopliae*.** As quitinasas de cada organismo representado foram identificadas utilizando as 18 sequências oriundas de *H. jecorina*. Todas as sequências resultantes obtidas foram utilizadas nas buscas por quitinasas no genoma de *M. anisopliae* até a redundância dos resultados. As caixas azuis superiores indicam o número de quitinasas preditas para *M. anisopliae* pertencentes a cada subgrupo conforme Seidl *et al.* (2005). As caixas azuis inferiores representam a redundância de *contigs* obtida nas buscas realizadas utilizando-se as quitinasas contidas no banco de dados SwissProt ou o domínio conservado DxxDxDxE. As caixas verdes na extremidade direita da figura representam quantos *contigs* de um total de 25 foram encontrados utilizando as quitinasas dos nove fungos demonstrados.

Os dois *contigs* restantes apresentam o domínio GH18 além de outras características de quitinases, no entanto, a sequência da proteína predita apresenta vários códons de parada contidos no interior de regiões codificadoras importantes. Existe a possibilidade de que estas sequências sejam pseudogenes. Alinhamentos destas sequências com as outras 23 indicam que as duas seriam pertencentes ao subgrupo C.

Na tentativa de verificar a presença de quitinases da família 19 das glicosil hidrolases, duas sequências de aminoácidos desta família, oriundas de plantas, *Pringlea antiscorbutica* (no. acesso AAP94636) e *Arabidopsis thaliana* (NP\_188317) foram utilizadas em buscas no genoma de *M. anisopliae*. Através desta metodologia não foi possível detectar similaridade entre as sequências contidas nos *contigs* do bando de dados de *M. anisopliae* e as sequências das quitinases GH19. Desta forma, acredita-se que, assim como outros fungos filamentosos (SEIDL *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2008), *M. anisopliae* não apresenta quitinases pertencentes à família GH19.

#### 4.4.2. Classificação das Quitinases

Com base na classificação de Seidl *et al.* (2005) as 23 quitinases preditas de *M. anisopliae* foram agrupadas nos subgrupos A, B e C. A categorização das quitinases de *M. anisopliae* foi obtida tanto pela detecção dos domínios presentes em cada uma das sequências quanto pelo alinhamento com as quitinases de *H. jecorina*. Das 23 quitinases, nove agruparam-se com as quitinases do subgrupo A, sete agruparam-se ao subgrupo B e quatro agruparam-se ao subgrupo C (Figura 12). Além disso, três quitinases de *M. anisopliae* permaneceram em uma ramificação separada dos subgrupos já conhecidos e agruparam-se com a quitinase chi18-15 de *H. jecorina*, a qual não é acrescentada nas análises filogenéticas de Seidl *et al.* (2005) devido a sua discrepância com todas as outras. Essas três quitinases diferenciam-se por não apresentarem íntrons. É possível que este grupo de quitinase forme um quarto e novo subgrupo, chamado então de subgrupo “D”, seguindo a lógica da classificação em subgrupos. Propomos, então, uma nova nomenclatura para diferenciar os genes e proteínas do complexo quitinolítico de *M. anisopliae*, classificando-os a partir dos subgrupos determinados por Seidl *et al.*, (2005) em ChiMaAs (ChiMaA1 a ChiMaA9), ChiMaBs (ChiMaB1 a ChiMaB7), ChiMaCs

(ChiMaC1 a ChiMaC4) e ChiMaDs (ChiMaD1 a ChiMaD3), diferentemente da nomenclatura baseada no grupo funcional GH18 e no tamanho molecular da proteína (ex. chi18-1, chi18-2, etc...).

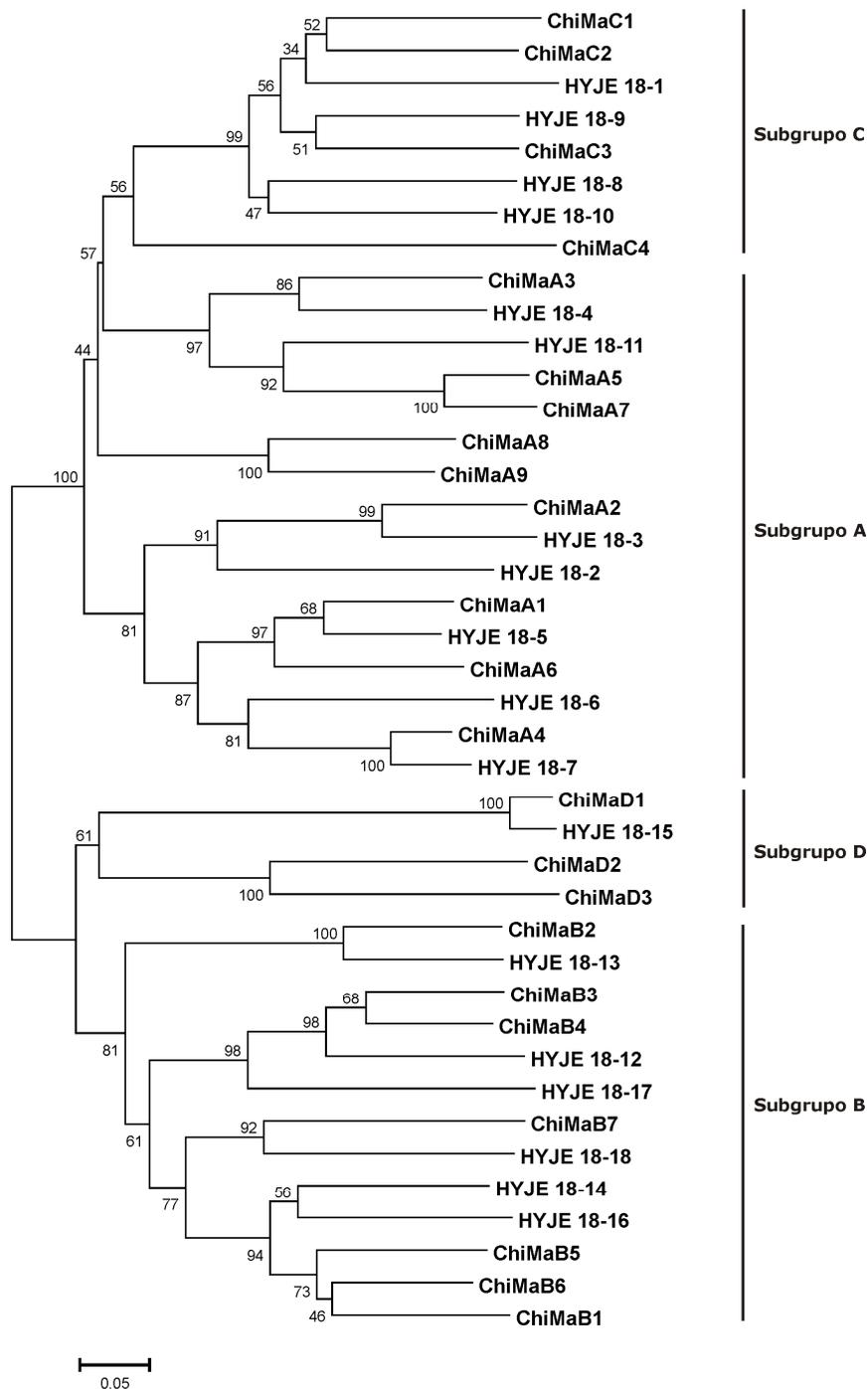
Ao analisar os domínios GH18 obtidos pelo Banco de Dados de Domínios Conservados do NCBI (CDD), pode-se perceber que existem diferentes tipos derivados deste domínio catalogados por este banco de dados. As 23 quitinases de *M. anisopliae* preditas apresentaram maior similaridade com alguns destes domínios, sendo eles: “GH18\_chitinase”, “GH18\_chitolectin\_chitotriosidase”, “GH18\_hevamine\_XipI\_classIII”, “GH18\_zymocin\_alpha”, “GH18\_chitinase\_D-like” e “GH18\_CTS3\_chitinase”. Todos estes domínios pertencem à superfamília “GH18\_chitinase-like”, juntamente com outros tipos não citados aqui. Observando estes tipos de domínios GH18 encontrados nas quitinases de *M. anisopliae* preditas, percebe-se que eles coincidem com quitinases de um mesmo subgrupo. Estes domínios representam aqueles com maior valor de escore obtido para cada quitinase. As quitinases do subgrupo A apresentam maior similaridade com os domínios “GH18\_chitinase”, “GH18\_chitolectin\_chitotriosidase”; todas as quitinases do subgrupo B apresentam maior similaridade com “GH18\_hevamine\_XipI\_classIII”; todas as quitinases do subgrupo C apresentam maior similaridade com “GH18\_zymocin\_alpha” e as quitinases do subgrupo D, com “GH18\_chitinase\_D-like” e “GH18\_CTS3\_chitinase”.

Desta maneira, além da classificação realizada de acordo com o alinhamento com as quitinases de *H. jecorina* e com a árvore filogenética resultante (Figura 12), a presença dos diferentes tipos de domínios GH18 catalogados no CDD também suporta a classificação das quitinases de *M. anisopliae* realizada neste trabalho.

Analisando o agrupamento das quitinases na árvore filogenética que contém as proteínas de *M. anisopliae* e de *H. jecorina*, percebe-se que todas as quitinases de *H. jecorina* pertencentes a um determinado subgrupo agrupam-se com as quitinases preditas neste trabalho do mesmo subgrupo. Exceto pela quitinase chi18-18, classificada por Seidl *et al.* (2005) como uma quitinase pertencente ao subgrupo A, que se agrupa juntamente com as proteínas do subgrupo B. Essa quitinase parece ser um ortóloga a quitinase ChiMaB7, e ambas apresentam maior similaridade com o domínio CDD do tipo “GH18\_hevamine\_XipI\_classIII” nas buscas do NCBI. Ambas quitinases apresentam o domínio “não-estruturado” rico em serinas e treoninas, que as diferenciam de todas as outras quitinases, não somente pela composição deste domínio, mas também pelo tamanho

ampliado que elas apresentam. Os autores do trabalho (SEIDL *et al.*, 2005) não apresentam uma árvore filogenética com todas as 18 quitinases de *H. jecorina*, pois relatam que um alinhamento confiável não foi alcançado devido a similaridades insuficientes apresentadas por alguns membros dessa família de proteínas. Devido a este fato, foram construídas três árvores filogenéticas separadas por subgrupos. No entanto, apesar de também termos detectado que realmente existem discrepâncias entre os membros dessa família, foi possível realizar o alinhamento que resultou na árvore da Figura 12. A árvore filogenética resultante do alinhamento entre somente as quitinases preditas de *M. anisopliae* pode ser observada no Anexo 1. A confiança neste alinhamento reside no fato de que várias regiões conservadas foram alinhadas entre todos os membros, mesmo com as diferenças encontradas. Algumas das regiões alinhadas são frequentemente conservadas em quitinases e podem ser observadas mais adiante na Figura 14 e no Anexo 2.

Na árvore filogenética da Figura 12 também pode ser observado que as quitinases apresentam-se separadas em duas ramificações principais, nas quais as quitinases dos subgrupos A e C parecem ser filogeneticamente mais relacionadas entre si, assim como as quitinases dos subgrupos B e D.



**Figura 12.** Árvore filogenética das quitinases da família 18 de *M. anisopliae* e de *H. jecorina*. As sequências de aminoácidos das quitinases de *H. jecorina* (HYJE) foram obtidas do banco de dados do NCBI. Árvores filogenéticas das quitinases foram realizadas no software Mega 4.1 utilizando *Neighbour Joining* (1.000 *bootstraps*), após alinhamento no software ClustalX2 conforme item 4.3.3. A barra indica a distância genética, sendo proporcional ao número de substituições de aminoácidos.

#### 4.4.3. Propriedades das Quitinases de *M. anisopliae*

As ORFs preditas foram caracterizadas pela utilização de ferramentas de predição *in silico*. Foram analisados o tamanho das sequências, os íntrons, a presença de peptídeo-sinal, a massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas. A Tabela 5 demonstra algumas das características de cada quitinase identificada. Quatorze das quitinases preditas parecem ser proteínas acídicas apresentando ponto isoelétrico menor do que 6,0 e apenas três delas apresentam ponto isoelétrico acima de 7,0. Seis apresentam pI em torno de 6,0. St. Leger *et al.* (1996b), ao analisar o sistema quitinolítico de três espécies de fungos, sugerem que as isoenzimas acídicas de *M. anisopliae* apresentam especificidade para clivar apenas oligômeros de GlcNAc com mais de quatro resíduos, caracterizando-as como endoquitinases, enquanto as isoenzimas básicas seriam exoquitinases. Além disso, este autor também comenta que os géis de atividade de quitinase contendo glicol-quitina detectariam apenas endoquitinases, já que a glicol-quitina não seria substrato para exoquitinases. Esta observação concorda com o trabalho anterior (ST. LEGER *et al.*, 1993), onde foi possível observar múltiplas bandas de degradação de glicol quitina, as quais podem ser indicativas da atividade das várias quitinases acídicas preditas neste trabalho.

Em dois trabalhos nos quais foram realizadas buscas genômicas por quitinases (SEIDL *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2008), quase todas as quitinases preditas também parecem ser proteínas acídicas. Dentre as dezoito e as quinze quitinases preditas em *H. jecorina* e *C. globosum*, respectivamente, apenas uma de cada organismo possui característica alcalina (ponto isoelétrico de 9,96 e 8,5, respectivamente).

**Tabela 5. Propriedades das 23 quitinases preditas de *M. anisopliae*.** As quitinases preditas foram identificadas e separadas em subgrupos (S). Estão informados o tamanho de cada proteína em nucleotídeos, aminoácidos e kDa; e o ponto isoelétrico respectivos. As quitinases já descritas estão demarcadas em negrito. O tamanho em kDa da proteína madura está desconsiderando a sequência peptídeo sinal predita. \* ausência de peptídeo sinal. Na coluna referente ao tamanho da proteína madura, encontra-se entre parênteses e em negrito o tamanho da proteína observado experimentalmente.

Identificação	S	Tamanho (nt)	Tamanho (aa)	pI / kDa teóricos	kDa teórico da proteína madura
<b>chiMaA1 (<i>chit1</i>)</b>		1.525	424	5,38 / 46,15	43,94 ( <b>42</b> )
chiMaA2		1.321	359	8,19 / 38,60*	38,60
chiMaA3		1.306	397	5,2 / 45,00	42,80
chiMaA4		1.301	395	4,91 / 44,18*	44,18
chiMaA5	<b>A</b>	1.309	369	5,75 / 40,51	38,78
chiMaA6		1.461	420	8,81 / 45,40	43,49
chiMaA7		1.289	372	5,17 / 41,30	39,36
chiMaA8		1.209	402	4,61 / 43,76	41,67
chiMaA9		1.188	395	6,06 / 43,41	41,20
<b>chiMaB1 (<i>chi2</i>)</b>		1.544	419	5,26 / 43,68	41,96 ( <b>42</b> )
<b>chiMaB2 (<i>chi3</i>)</b>		1.011	317	5,24 / 34,14	32,16 ( <b>30 e 32,4</b> )
chiMaB3		1.304	329	6,14 / 34,95	32,71
chiMaB4	<b>B</b>	1.442	421	4,93 / 44,20	41,78
chiMaB5		921	306	5,14 / 33,02*	33,02
chiMaB6		1.023	340	4,82 / 35,21	33,30
ChiMaB7		2.525	793	7,88 / 82,04	80,63
chiMaC1		4.758	1.370	5,18 / 150,58	148,23
chiMaC2	<b>C</b>	4.111	1.100	6,09 / 120,87*	120,87
chiMaC3		3.769	1.170	6,40 / 128,63	126,175
chiMaC4		3.582	1.092	6,44 / 122,55	120,39
chiMaD1		1.038	345	5,55 / 36,59	33,810
chiMaD2	<b>D</b>	1.017	338	5,59 / 37,58*	37,58
chiMaD3		978	325	6,09 / 36,25	34,33

Em relação ao tamanho, as quitinases preditas apresentaram um tamanho médio de 530 aminoácidos e 56,12 kDa. No entanto, dezoito das 23 quitinases possuem um tamanho menor do que esta média total (Tabela 5). Se forem desconsideradas as cinco quitinases que apresentam um tamanho muito superior (no mínimo o dobro do tamanho), as dezoito restantes possuem uma média de tamanho de 351 aminoácidos e 36,56 kDa. As quitinases do subgrupo C apresentam um tamanho maior em relação aos outros subgrupos, sendo que a média entre elas é de 128,91 kDa e 1.183 aminoácidos. Estes dados estão de acordo com aqueles descritos na revisão sobre quitinases fúngicas (DUO-CHUAN, 2006) que descreve a ampla diversidade de tamanhos para as quitinases, as quais apresentam entre 27 e 190 kDa e pontos isoeletrônicos entre 3 e 8.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo foram estudadas as três quitinases ChiMaA1 (chamada anteriormente de CHIT42, codificada pelo gene *chit1*), ChiMaB1 (CHI2) e ChiMaB2 (CHIT30) (PINTO *et al.*, 1997; BOGO *et al.*, 1998; BARATTO *et al.*, 2003 e 2006; DA SILVA *et al.*, 2005; BOLDO *et al.*, 2009). Como pode ser observado na Tabela 5, o tamanho observado experimentalmente para essas proteínas está de acordo com as previsões realizadas. A proteína CHIT30 apresentou 30 kDa em gel de SDS-PAGE e 32,4 kDa em gel filtração em coluna de Sephadex G-150 (PINTO *et al.*, 1997; DA SILVA *et al.*, 2005). Ambas as quitinases CHI2 (ChiMaB1) (BOLDO *et al.*, 2009) e CHIT42 (ChiMaA1) (KERN *et al.*, 2010) apresentaram 42 kDa experimentalmente.

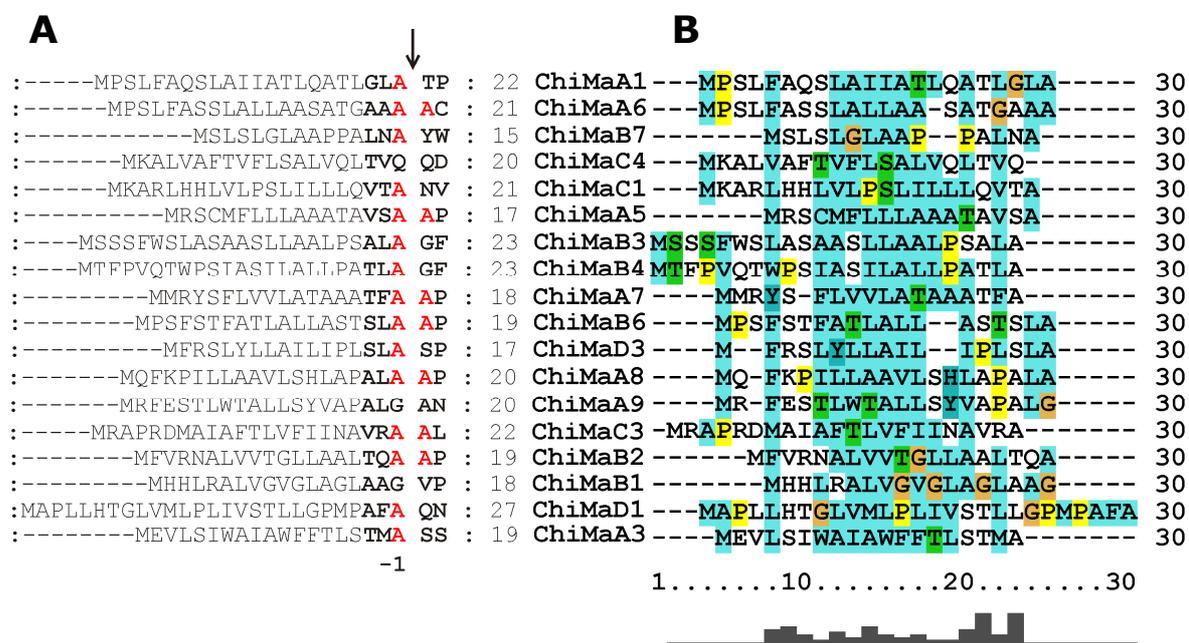
Além disso, comparando o tamanho predito das quitinases analisadas neste trabalho com o tamanho das bandas encontradas nos géis de glicol-quitina (ST. LEGER *et al.*, 1993; DA SILVA *et al.*, 2005) pode-se observar uma certa concordância. Inúmeras bandas resultantes da degradação do substrato ficam aparentemente sobrepostas e colocalizadas entre 45 e 66 kDa em ambos os trabalhos. Como pode ser observado na tabela 5, apesar das quitinases apresentarem tamanhos um pouco abaixo dos 45 kDa, quaisquer modificações pós-traducionais nestas proteínas, aumentariam sua massa molecular para valores aproximados deste. Já foi descrito que algumas quitinases secretadas de *T. reesei* apresentam esse tipo de modificação (KRUSZEWSKA *et al.*, 2008). É sugerido que as proteínas são glicosiladas para manter a sua estrutura e a sua estabilidade caso sejam secretadas (WALLIS *et al.*, 1999) e, desta maneira, podem apresentar tamanhos maiores em géis de SDS-PAGE. De fato, analisando potenciais sítios de glicosilação nestas proteínas, foram encontrados alguns sítios prováveis (Tabela 6).

**Tabela 6. Número de potenciais sítios de N-glicosilação em asparaginas preditos para cada quitinase de *M. anisopliae* E6. Predição realizada pela ferramenta ScanProSITE.**

Quitinase	No. de sítios de glicosilação	Quitinase	No. de sítios de glicosilação	Quitinase	No. de sítios de glicosilação
ChiMaA1	5	ChiMaB1	3	ChiMaC1	7
ChiMaA2	2	ChiMaB2	4	ChiMaC2	4
ChiMaA3	1	ChiMaB3	-	ChiMaC3	7
ChiMaA4	3	ChiMaB4	2	ChiMaC4	1
ChiMaA5	3	ChiMaB5	-		
ChiMaA6	10	ChiMaB6	2	ChiMaD1	3
ChiMaA7	1	ChiMaB7	2	ChiMaD2	4
ChiMaA8	5			ChiMaD3	3
ChiMaA9	3				

*Sequências de Localização Celular:*

De acordo com as predições realizadas pela ferramenta SignalP, 18 das 23 quitinases apresentam peptídeo sinal na região N-terminal. O tamanho médio dessas sequências foi de 20 (desvio padrão: 2,89) resíduos de aminoácidos, sendo 15 o menor peptídeo sinal (compreendido em ChiMaB7) e 27 o maior (em ChiMaD1) (Figura 13A). Pôde ser observada a estrutura de três domínios característica para peptídeos sinal: um domínio N básico, um domínio H (com entre 7-13 resíduos) hidrofóbico e um domínio C pouco polar (NIELSEN *et al.*, 1997; HEDGE & BERNSTEIN, 2006). No domínio H estão localizados primariamente os resíduos hidrofóbicos de alanina, leucina, valina e isoleucina, não interrompidos por resíduos de aminoácidos carregados (Figura 13B). O resíduo -1 em relação ao sítio de clivagem foi uma alanina em 83% dos casos (com exceção das sequências presentes em ChiMaA9, B1 e C4), como característico de eucariotos (NIELSEN *et al.*, 1997). Pode ser observado também que cada subgrupo apresenta representantes que não possuem peptídeo sinal predito (ChiMaA2, A4, ChiMaB5, ChiMaC2 e ChiMaD2).



**Figura 13. Sequência de aminoácidos que compõe o peptídeo sinal e sítio de clivagem respectivo preditos (SignalP) para as quitinases de *M. anisopliae* e alinhamento dos mesmos.** Em A: Numeração na coluna da direita indica o tamanho do peptídeo sinal predito para cada quitinase. Em negrito estão destacados os aminoácidos do sítio de clivagem e em vermelho os resíduos de Alanina conservados. Em B: alinhamento entre as sequências de aminoácidos dos peptídeos sinais preditos realizado no programa ClustalX. As cores representam grupos de aminoácidos: hidrofóbicos (azul), serinas e treoninas (verde), glicinas (laranja) e prolinas (amarelo).

Apesar de apresentarem peptídeos sinais preditos, estes dados ainda são insuficientes para determinar que todas as dezoito quitinases serão secretadas e as outras cinco quitinases serão intracelulares. Dados experimentais são necessários para estas confirmações. Dentre as três quitinases previamente estudadas experimentalmente, a quitinase CHIT42 (ChiMaA1), a endo-exoquitinase CHIT30 (ChiMaB2) e a endoquitinase CHI2 (ChiMaB1), todas foram detectadas em sobrenadantes de cultivo (PINTO *et al.*, 1997; BARRETO *et al.*, 2003; BOLDO *et al.*, 2009).

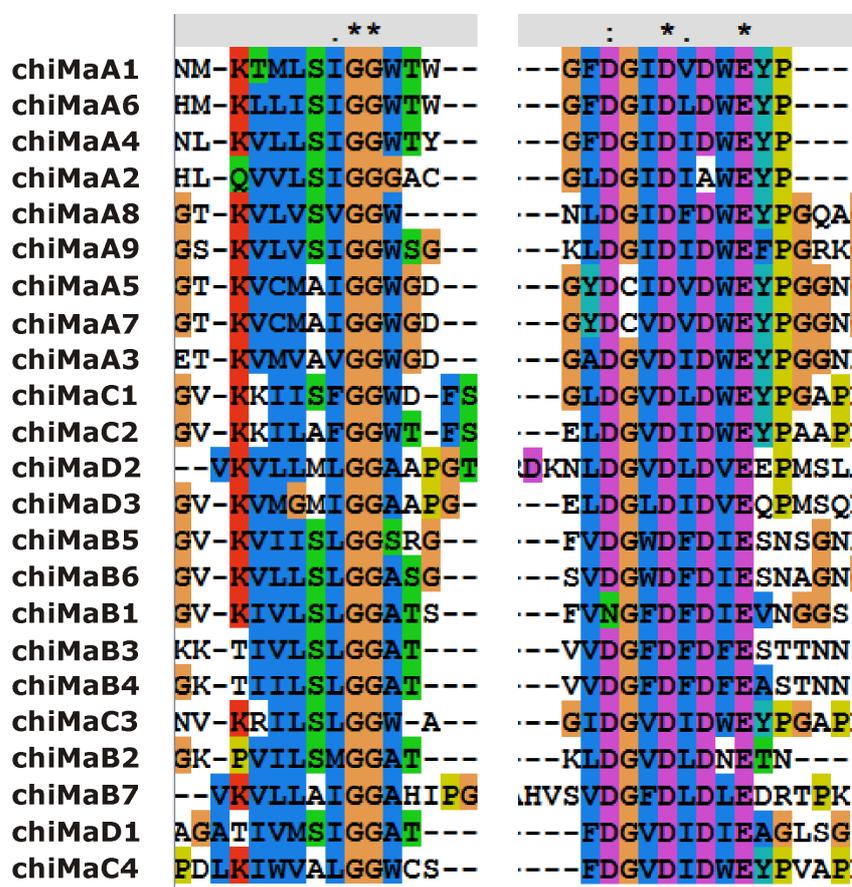
Ainda, há a possibilidade de algumas das quitinases estarem ligadas à superfície do esporo. Uma das possibilidades de ligação à parede celular está relacionada à modificação pós-traducional que adiciona âncoras de GPI às proteínas (ORLEAN & MENON, 2007). Conforme análise feita no software Big-PI Fungal Predictor, o qual é específico para fungos, nenhuma das quitinases apresentou um possível sítio para ancoramento a GPI. No entanto, o fato de não ter sido detectado um potencial sítio de ligação à GPI, não exclui a ligação à superfície celular por outro mecanismo. No trabalho de Santi *et al.* (2010), onde foram estudadas as proteínas de *M. anisopliae* ligadas a superfície do esporo, foi detectada a atividade de quitinase nestes extratos. Essa atividade foi detectada tanto por zimogramas contendo glicol-quitina, quanto por ensaios enzimáticos utilizando substratos fluorogênicos sintéticos de quitina-oligômeros (tetraose, triose e quitobiose), o que indica a presença de endo e exoquitinases ou de uma endo-exoquitinase ligadas à parede celular. Nos zimogramas foram detectadas sete bandas de degradação de glicol-quitina, correspondendo a sete diferentes quitinases ácidas presentes na superfície do esporo. Ainda, utilizando a mesma metodologia de extração de proteínas da superfície celular, Santi *et al.* (2009), também detectaram a presença de uma quitinase por imunoproteômica diferencial. Os três peptídeos sequenciados resultantes do experimento são oriundos da quitinase CHIT42 (ChiMaA1). Estes dados indicam que a localização final das quitinases em *M. anisopliae* não é somente determinada pela presença de sequências peptídeo sinal ou pela ausência de ancoramentos a GPI. Como pôde ser observado, a quitinase ChiMaA1, que apresenta peptídeo sinal, já foi detectada em sobrenadantes de cultivo e também ligada a parede celular.

Além disso, de acordo com outras predições *in silico*, algumas das proteínas apresentam sequências de localização em mitocôndrias. ChiMaA2 e A4 parecem apresentar uma sequência de localização na matriz mitocondrial predita pelo software WolfPSORT, assim como a quitinase chi18-3 de *H. jecorina*.

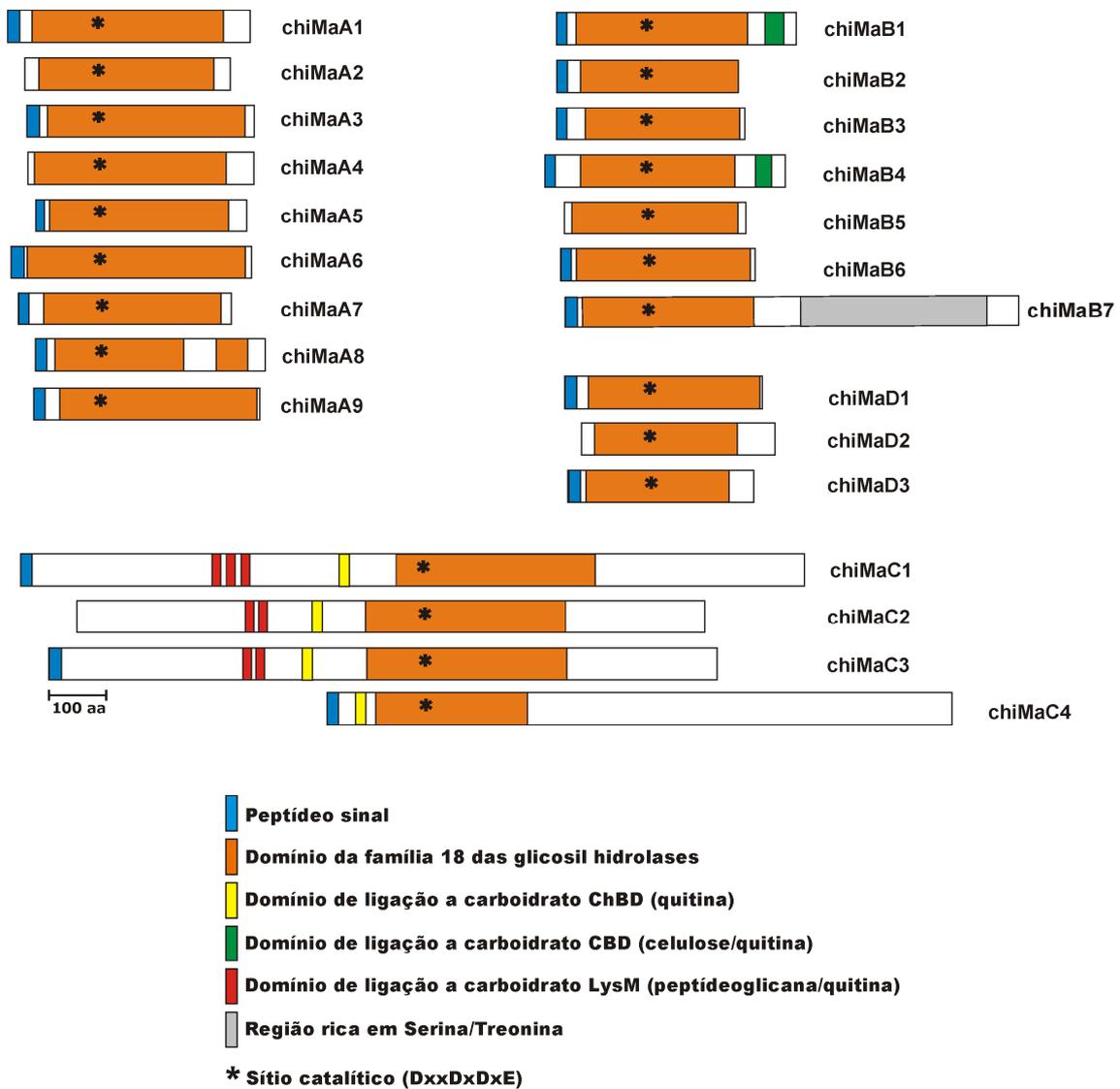
#### *Estruturas de Domínios Funcionais das Quitinases:*

Os domínios funcionais frequentemente encontrados em quitinases (GH18, ChBD, CBD e LysM) foram detectados nas proteínas preditas de *M. anisopliae* através da utilização das ferramentas CDD (*Conserved Domain Database*, NCBI) e InterProScan. O domínio GH18 característico da família de quitinases foi detectado em todas as quitinases

preditas, apresentando as sequências conservadas DxxDxDxE e S/AxGG, como pode ser observado nas Figuras 14 e 15. O motivo DxxDxDxE compreende o sítio catalítico desta família de proteínas, sendo o resíduo de glutamato (E) essencial para este motivo e potencial doador de prótons necessário para a clivagem da ligação glicosídica (SYNTAD *et al.*, 2004). A ausência deste resíduo específico no sítio ativo está presente em quitolectinas, que são proteínas ligadoras de quitina, mas que não possuem atividade catalítica. A substituição deste resíduo por uma glutamina ou por um ácido aspártico resultou em perda total da atividade no inseto *M. sexta* (LU *et al.*, 2002). A sequência conservada S/AxGG compreende a região de ligação a quitina contida no domínio GH18.



**Figura 14.** Presença dos domínios conservados SxGG e DxxDxDxE nas quitinases preditas de *M. anisopliae*. As sequências de aminoácidos das quitinases foram alinhadas no programa ClustalX (conforme seção 4.3.3). As cores de fundo dos aminoácidos estão de acordo com a definição padrão (*default*) do programa.\* - indica 100% de conservação dos resíduos de aminoácidos alinhados.



**Figura 15.** Estrutura de domínios dos diferentes subgrupos das quitinasases de *M. anisopliae*. Domínios protéicos identificados utilizando o banco de dados de domínios conservados (CDD) do NCBI e InterProScan são mostrados. Regiões de peptídeos sinal preditas por SignalP 3.0. Em branco, regiões das proteínas sem domínios identificados.

O único domínio apresentado pelas quitinases preditas para o subgrupo A é o domínio GH18, o qual compreende grande parte da proteína em termos de extensão (Figura 15). A maior parte dessas proteínas apresenta também um potencial peptídeo sinal, com exceção de ChiMaA2.

Nas quitinases do subgrupo B pode estar presente o domínio de ligação à celulose (CBD, IPR000254). Dentre as quitinases de *M. anisopliae* classificadas no subgrupo B, apenas ChiMaB1 e B4 apresentam este domínio, localizado na região C-terminal da proteína (Figura 15). Este resultado difere em termos de proporção, às quitinases do subgrupo B de *H. jecorina*, das quais quatro entre os cinco membros apresentam o domínio CBD (SEIDL *et al.*, 2005). Na revisão sobre quitinases fúngicas, Seidl (2008) observa que existe de fato uma variação no número de domínio CBD encontrados nos membros do subgrupo B.

A quitinase ChiMaB7, ortóloga de *chi18-18* (Figura 12), apresenta o domínio “não estruturado” citado por Seidl *et al.* (2005), composto por uma região rica em serinas e treoninas (PS50325 e PS50324) e é relativamente maior do que as outras quitinases classificadas neste subgrupo. Este domínio não apresenta função conhecida.

Nas quitinases do subgrupo C, de alta massa molecular (>120 kDa), pôde ser detectada a presença de domínios do tipo LysM (no. de acesso do InterProScan: IPR002482), os quais podem se ligar a estruturas similares a peptídeoglicanas e também a oligossacarídeos de quitina (BATEMAN & BYCROFT, 2000). Foram encontrados três domínios LysM em ChiMaC1 e dois em ChiMaC2 e ChiMaC3. Até hoje, 4.000 proteínas fúngicas que contém domínios LysM estão depositadas em bancos de dados públicos (JONGE & THOMMA, 2009). Estes autores propõe que os domínios LysM possam se ligar em oligossacarídeos de quitina oriundos da quebra da parede celular fúngica que ocorre durante a invasão nos hospedeiros, para impedir a ativação do sistema de defesa do hospedeiro, que reconheceria estes oligossacarídeos como PAMPS (padrões moleculares associados a patógenos).

Neste mesmo subgrupo C, também é encontrado o domínio de ligação a quitina do tipo 1 (ChBD, IPR001002), em ChiMaC1, ChiMaC2, ChiMaC3 e ChiMaC4. Podem ser detectadas oito cisteínas, formadoras de pontes dissulfeto intra-domínio. Recentemente, o domínio ChBD foi considerado distinto do domínio de ligação a celulose (CBD) e é classificado em três tipos. O tipo 1 é encontrado em fungos e plantas, o tipo 2 em vírus e insetos e o tipo 3 em bactérias. O ChBD de fungos é similar

ao de plantas no fato de conter resíduos de cisteína conservados. De maneira oposta, vários resíduos aromáticos, principalmente o triptofano, são proeminentes entre os resíduos conservados em ChBD de bactérias. Aparentemente, a função deste domínio é ancorar a enzima fortemente em um substrato polimérico insolúvel (DUO-CHUAN, 2006). Este domínio também está presente na subunidade alfa da toxina *killer* de *K. lactis* (BUTLER *et al.*, 1991).

#### *Análise de Íntrons das Quitinases:*

Os íntrons das quitinases de *M. anisopliae* foram preditos, primeiramente, através da análise do alinhamento entre a sequência de nucleotídeos traduzida oriunda dos *contigs* positivos para a presença de quitinases (conforme seção 4.3.1) e a sequência de aminoácidos das quitinases utilizadas nas buscas de biomineração. Os dados obtidos podem ser observados na Tabela 7. Como pode ser observado, alguns dos genes que codificam as quitinases de *M. anisopliae* não apresentam íntrons. Os genes das quitinases do subgrupo A que possuem íntrons apresentam uma média de 2,5 íntrons por gene, os genes do subgrupo B que possuem íntrons apresentam uma média de 2,4 íntrons por gene e os genes do subgrupo C apresentam uma média de 3,75 íntrons por gene. A média do número de íntrons por gene aumenta conforme o aumento do tamanho das ORFs. Os genes do subgrupo D não apresentam íntrons.

Em relação ao tamanho dos íntrons, o subgrupo A apresenta um tamanho médio de 66 nt, o subgrupo B apresenta um tamanho médio de 79 nt e o subgrupo C apresenta a maior média de tamanho de íntrons, de aproximadamente 105 nt. O tamanho dos íntrons varia de 50 nt até 261 nt, sendo que a maior parte dos íntrons apresenta tamanhos médios de 68 nt (excluindo-se os 6 íntrons com mais de 100 nt). De acordo com Kupfer *et al.* (2004) os íntrons de fungos são menores do que os de eucariotos superiores, e em *A. nidulans*, *N. crassa* e *C. neoformans* os íntrons apresentam um pico de distribuição entre 50 e 70 nt. Neste mesmo estudo, os autores detectaram que entre 98 e 99,9% dos íntrons avaliados em cinco diferentes fungos apresentaram o par de sítios de *splicing* doador e acceptor canônicos (5'GU...AG3'). Todos os íntrons analisados possuem as sequências canônicas conservadas: os sítios de *splicing* 5' (5'GU..), o sítio de *splicing* 3' (..AG3') e o ponto de ramificação (A).

**Tabela 7. Número de íntrons das quitinases de *M. anisopliae*. O número de íntrons para cada gene e o tamanho dos íntrons está indicado.**

Identificação	S	No. de íntrons	Tamanho dos íntrons (nt)	Tamanho do gene (nt)
<b>chiMaA1 (<i>chit1</i>)</b>		3	99 / 67 / 80	1.525
chiMaA2		3	79 / 82 / 77	1.321
chiMaA3		2	50 / 62	1.306
chiMaA4		2	56 / 55	1.301
chiMaA5	<b>A</b>	3	76 / 53 / 70	1.309
chiMaA6		3	65 / 68 / 65	1.461
chiMaA7		2	60 / 55	1.289
chiMaA8		-	-	1.209
chiMaA9		-	-	1.188
<b>chiMaB1 (<i>chi2</i>)</b>		2	209 / 75	1.544
<b>chiMaB2 (<i>chi3</i>)</b>		1	56	1.011
chiMaB3		4	63 / 61 / 78 / 102	1.304
chiMaB4	<b>B</b>	3	62 / 50 / 52	1.442
chiMaB5		-	-	921
chiMaB6		-	-	1.023
ChiMaB7		2	69 / 74	2.525
chiMaC1		3	64 / 80 / 90	4.758
chiMaC2		6	86 / 206 / 83 / 59 / 261 / 99	4.111
chiMaC3	<b>C</b>	3	121 / 62 / 69	3.769
chiMaC4		3	172 / 70 / 61	3.582
chiMaD1		-	-	1.038
chiMaD2	<b>D</b>	-	-	1.017
chiMaD3		-	-	978

#### 4.4.4. Análises Filogenéticas das Quitinases

Dentre as quitinases de outros fungos já caracterizadas, muitas apresentaram similaridades com as proteínas preditas de *M. anisopliae*, no entanto somente algumas serão utilizadas para comparações neste trabalho. As sequências das quitinases utilizadas nas comparações pertencem: (i) as espécies fúngicas utilizados na biomineração realizada e (ii) as espécies fúngicas que apresentaram similaridades em buscas no banco de dados do NCBI utilizando a ferramenta BLASTp. As árvores filogenéticas resultantes dos alinhamentos realizados utilizando a sequência de aminoácidos destas quitinases ortólogas ou parálogas estão separadas por subgrupos (Figuras 16, 17, 18 e 19).

O subgrupo A contém quitinases relacionadas à CHIT42 (ChiMaA1), o subgrupo B contém quitinases relacionadas a CHI2 e CHIT30 (ChiMaB1 e B2). Já os subgrupos C e D não apresentam quitinases já estudadas anteriormente por nosso grupo. As quitinases de outras espécies do gênero *Metarhizum* também estão incluídas na árvore filogenética resultante deste alinhamento. Como pode ser observado, todas as quitinases de *M. anisopliae* apresentam ortólogos em fungos filamentosos, incluindo em alguns representantes ascomicetos filogeneticamente distantes. De acordo com Seidl *et al.* (2005) este fato pode indicar que estas proteínas/genes apresentam um ancestral comum anterior a evolução do grupo ascomiceto e que, portanto, é provável que estas proteínas possuam funções importantes no ciclo de vida destes organismos.

A árvore filogenética com as quitinases do subgrupo A (Figura 16) apresentou o agrupamento de várias quitinases em quatro clados distintos, conforme identificado anteriormente (SEIDL *et al.*, 2005). O clado II contém as quitinases chi18-11 e chi18-4 de *H. jecorina* e três quitinases de *M. anisopliae*, ChiMaA3, A5 e A7. Uma das diferenças entre as quitinases deste subgrupo dos dois fungos é que o clado III não contém nenhum representante de *H. jecorina* e, no entanto, apresenta as quitinases ChiMaA8 e A9 de *M. anisopliae*. O clado IV contém as quitinases chi18-3 e chi18-2 e apenas um representante de *M. anisopliae*, ChiMaA2. O clado V contém as quitinases chi18-5, chi18-7 e chi18-6 de *H. jecorina* e apresenta as três quitinases ChiMaA1, A6 e A7 de *M. anisopliae*. Neste clado, as quitinases chi18-5 e chi18-7 apresentam-se mais próximas filogeneticamente às quitinases ChiMaA1 e ChiMaA4, respectivamente;

enquanto a quitinase chi18-6 parece apresentar menor proximidade com as quitinases de *M. anisopliae*.

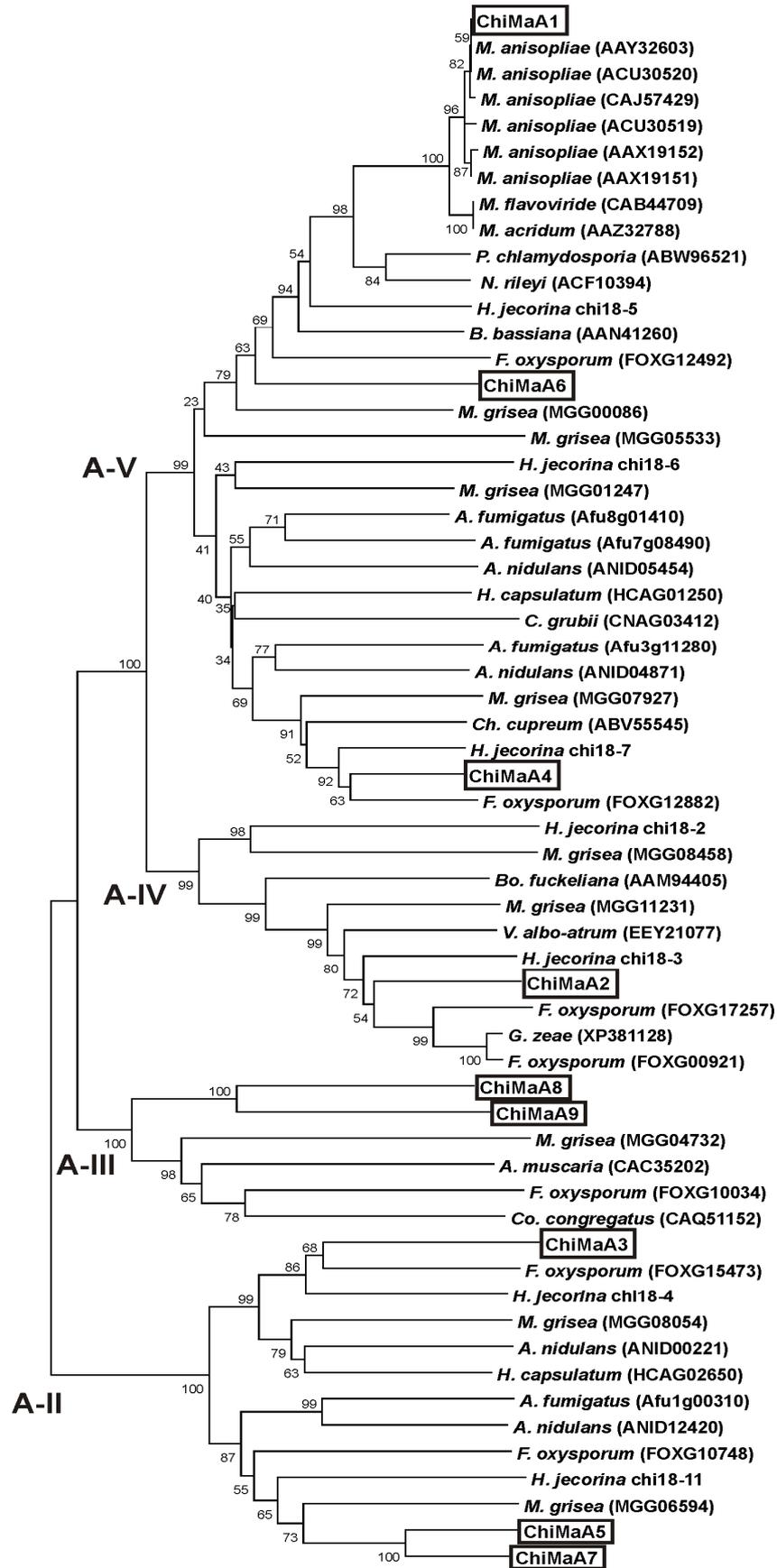
Pode-se observar também que as quitinases ChiMaA5 e A7 no clado II e ChiMaA8 e A9 no clado III são filogeneticamente mais próximas entre si do que às outras quitinases analisadas. Este fato pode indicar que os genes que codificam essas quitinases apresentam a possibilidade de serem parálogos, oriundos de um evento de duplicação gênica e diferenciação.

De fato, ao analisar os valores de identidade e similaridade das sequências de aminoácidos das quitinases preditas obtidos no resultado do alinhamento no programa GeneDoc, percebe-se que estes valores concordam com a distribuição das quitinases na árvore filogenética. As quitinases do subgrupo A apresentaram, entre si, valores de identidade que variam entre 13 e 79% e valores de similaridade que variam entre 24 e 87%, sendo que a média destes valores é 23% de identidade e 36% de similaridade entre este subgrupo de proteínas. As quitinases ChiMaA5 e A7 apresentam 79% de identidade e 87% de similaridade entre si e as quitinases ChiMaA8 e A9 apresentam 43% de identidade e 55% de similaridade. As duas quitinases com menor identidade entre si são ChiMaA2 e A3 (13%). Apesar de não apresentarem-se aparentemente tão próximas quanto ChiMaA8 e A9 agrupam-se na árvore filogenética, as quitinases ChiMaA1 e A6 possuem maior identidade entre si (59%) do que as duas primeiras.

Na Figura 16 estão contidas também seis sequências referentes a proteínas de *M. anisopliae*, uma sequência referente à *M. flavoviride* e uma referente à *M. acridum*. Estas sequências de aminoácidos foram obtidas do banco de dados do NCBI e correspondem a proteínas previamente detectadas pertencentes a outras variedades e espécies do gênero. Todas estas proteínas apresentam-se filogeneticamente próximas a quitinase ChiMaA1 (codificada pelo gene *chit1*). As quitinases ACU30520 e ACU30519 apresentam a sequência de aminoácidos incompleta; estas enzimas são oriundas de análises de PCR-RFLP para fenotipagem de *M. anisopliae* (ENKERLI *et al.*, 2009). A sequência das quitinases AAX19151 e AAX19152 também está incompleta e estas proteínas estão classificadas como quitinases tipo bacterianas no banco de dados. As quitinases AAY32603 e CAJ57429 estão apenas depositadas no banco de dados, mas não foram publicadas em trabalhos. Todas estas quitinases são provavelmente ortólogas de ChiMaA1 presentes nos diferentes isolados ou variedades de *M. anisopliae*.

As quitinases do subgrupo A foram detectadas em todos os fungos analisados, sugerindo uma distribuição ampla destas enzimas nos organismos. Entretanto, representantes dos outros três subgrupos, B, C e D, não foram encontrados em todos os fungos. Por exemplo, em *P. brasiliensis* (Pb01 e Pb18) e também em *C. neoformans* var. *gattii* R265 e *C. neoformans* var. *grubii* H99, não foram detectadas quitinases pertencentes ao subgrupo C. Já em *H. capsulatum* NAM1 não foram detectadas quitinases do subgrupo B.

A quitinase chi18-5 de *H. jecorina*, ortóloga de ChiMaA1 (CHIT42), é conservada entre os fungos ascomycetos (SEIDL *et al.*, 2005; SEIDL, 2008) e apresenta o maior número de ESTs depositadas em bancos de dados do genoma de *H. jecorina*, enquanto apenas dois ou quatro ESTs foram sequenciadas para as outras quitinases. Estes autores acreditam que é provável que esta proteína apresente função vital neste fungo.



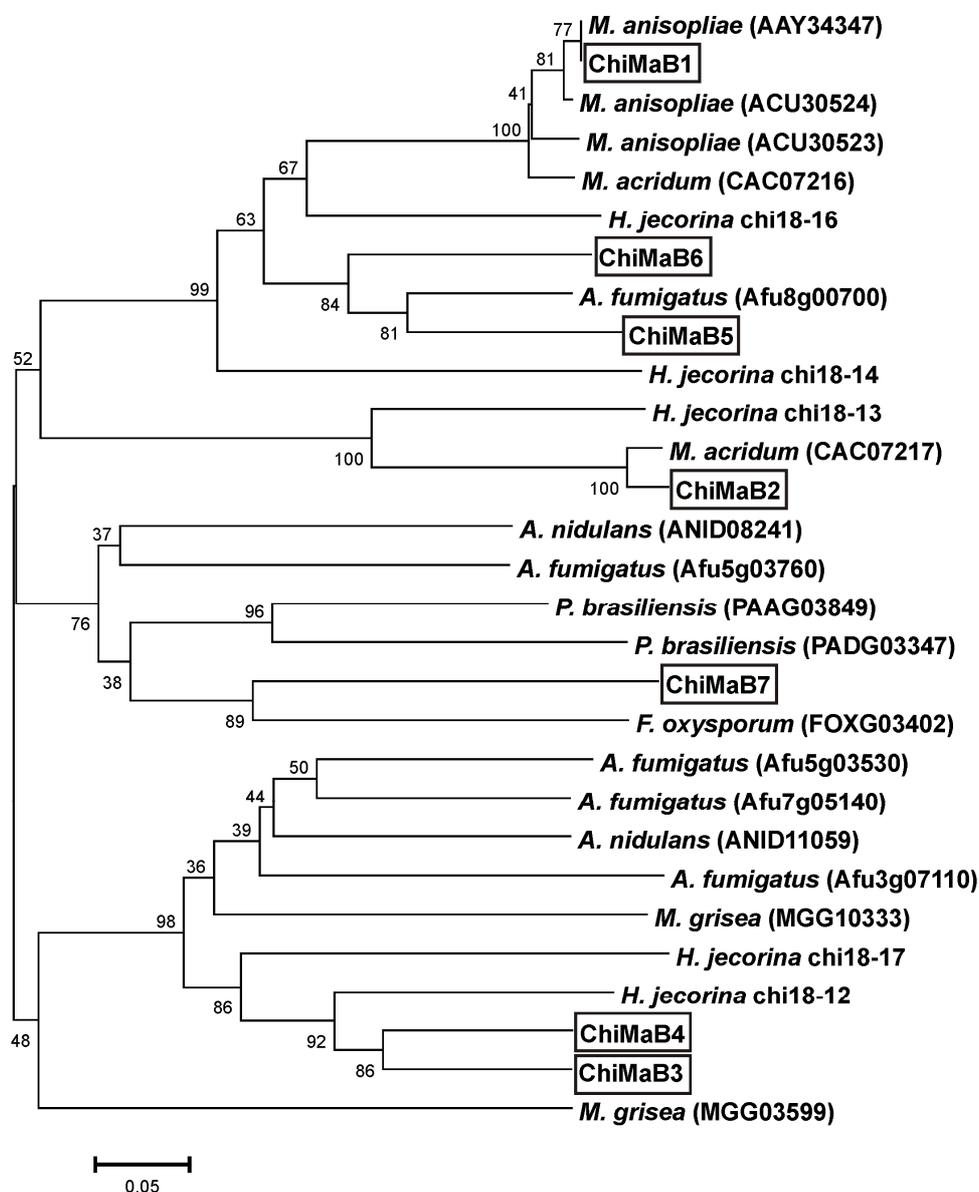
**Figura 16. Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo A de *M. anisopliae* e de outros fungos.** As sequências protéicas das quitinases foram obtidas do banco de dados do NCBI e BROAD Institute. Árvores filogenéticas das quitinases foram realizadas no software Mega 4.1, utilizando *Neighbour Joining* (1.000 *bootstraps*), após alinhamento no software ClustalX2. As quitinases de *M. anisopliae* estão indicadas nos retângulos.

Analisando a filogenia das quitinases de *M. anisopliae* pertencentes ao subgrupo B (Figura 17) percebe-se a formação de três ramificações principais, de maneira que as quitinases ChiMaB1 e B2, já estudadas experimentalmente são filogeneticamente mais próximas a ChiMaB5 e B6. A quitinase ChiMaB7 está separada das outras quitinases de *M. anisopliae*, o que coincide com a sua estrutura de domínios diferenciada. O tamanho maior e a presença de uma região rica em serinas e treoninas provavelmente contribuiu para que o fato desta proteína apresentar-se separada das outras e agrupar-se com ortólogos que também possuem as características citadas. As quitinases ChiMaB3 e B4 separam-se no terceiro clado e, apesar de agruparem-se com proteínas de outros fungos, elas são mais próximas filogeneticamente entre si. Este fato pode indicar que os genes que codificam essas quitinases apresentam a possibilidade de serem oriundos de um evento de duplicação gênica e diferenciação, assim como sugerido para ChiMaA5 e ChiMaA7. As quitinases ChiMaB1 e B2 apresentam ortólogos em outras linhagens de *M. anisopliae* e em *M. acridum*, obtidos do banco de dados do NCBI.

Os valores de identidade e similaridade apresentados para este subgrupo variam entre 7 e 64% e 11 e 77%, respectivamente. Como observado pela separação das quitinases nos clados da Figura 17, as quitinases ChiMaB4 e B3 apresentam 53% de identidade e 61% de similaridade entre si, mas esses valores por si só não determinam se os genes codificadores destas proteínas são oriundos de eventos de duplicação, pois as quitinases ChiMaB5 e B6, que não aparentam apresentar um ortólogo próximo de B6 em *A. fumigatus* apresentam valores de identidade e similaridade maiores (64 e 67%, respectivamente). Este agrupamento próximo de B3 e B4 (assim como ocorre entre ChiMaA8 e A9 e entre ChiMaA5 e A7) pode simplesmente refletir a falta de proteínas de outros fungos utilizadas para a montagem das árvores. O que não significa que não

existam quitinases destes outros fungos mais próximas aos representantes de *M. anisopliae* do que as utilizadas nas análises.

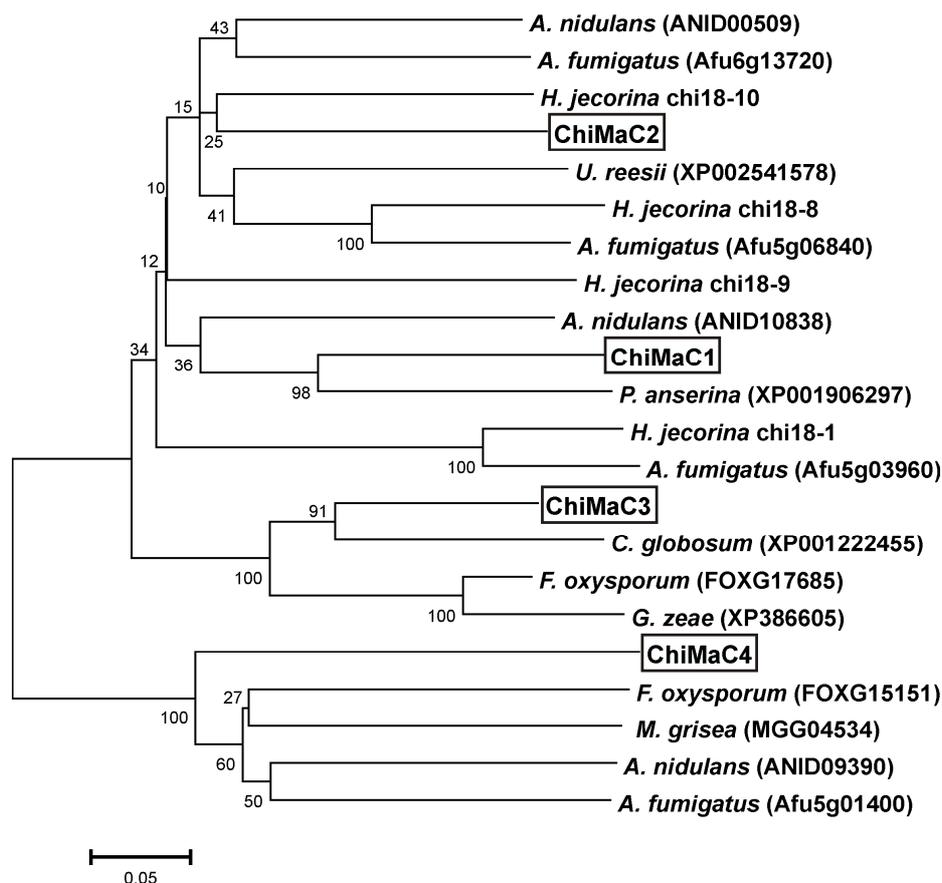
Este subgrupo contém as duas quitinases de *M. anisopliae* que apresentaram diferenças na virulência em linhagens que superexpressam ou deletadas para as quitinases ChiMaB1 e B2. Boldo *et al.* (2009) demonstrou que linhagens que superexpressaram o gene *chi2* (ChiMaB1) foram mais virulentas em comparação ao tipo selvagem frente ao hospedeiro *D. peruvianus*. Mutantes para este gene possuem virulência reduzida. Ainda, a deleção da quitinase ChiMaB2 (coficada pelo gene *chi3*) demonstrou uma menor virulência em bioensaios contra *D. peruvianus* (STAATS, 2007).



**Figura 17. Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo B de *M. anisopliae* e de outros fungos.** As sequências protéicas das quitinases foram obtidas do banco de dados do NCBI e BROAD Institute. Árvores filogenéticas das quitinases foram realizadas no software Mega 4.1, utilizando *Neighbour Joining* (1.000 *bootstraps*), após alinhamento no software ClustalX2. As quitinases de *M. anisopliae* estão indicadas nos retângulos.

Nenhuma das quitinases preditas de *M. anisopliae* pertencentes ao subgrupo C foram isoladas experimentalmente em trabalhos anteriores, de maneira que não eram conhecidas ainda enzimas desse subgrupo neste fungo. Como pode ser observado na Figura 18, as quatro proteínas representantes deste subgrupo apresentam potenciais ortólogos em outros fungos, o que suporta a classificação dessas proteínas no subgrupo C. A topologia da árvore filogenética indica que as quitinases ChiMaC1, C2 e C3 parecem ser filogeneticamente mais próximas entre si e distantes de ChiMaC4. Ainda, as três quitinases de *H. jecorina* também se aproximam mais de ChiMaC1, C2 e C3 do que de ChiMaC4. Este dado concorda com diferença na estrutura de domínios entre os membros deste subgrupo. As três quitinases C1, C2 e C3 apresentam domínios LysM, o qual está ausente em ChiMaC4. Além disso, considerando a extensão dessas proteínas, o domínio GH18 está deslocado para a região N-terminal em ChiMaC4, enquanto nas outras três este domínio está centralizado (Figura 15).

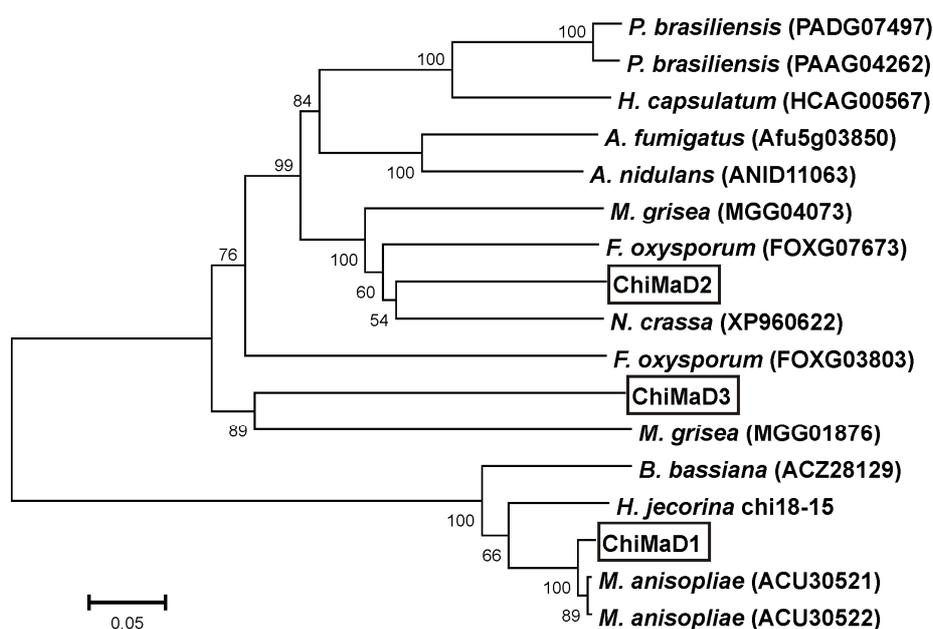
Este subgrupo de quitinases apresenta valores de identidade entre 6 e 29% e similaridade entre 12 e 41%. Estes valores mais baixos do que os encontrados para as quitinases dos outros subgrupos podem ser consequência do tamanho destas proteínas, o qual permite maiores diferenças entre aminoácidos que não constituem as regiões conservadas. Como observado na separação de clados na Figura 17, as quitinases C1, C2 e C3 apresentam valores de identidade (entre 22 e 24%) e similaridade maiores entre si do que na comparação com ChiMaC4 (entre 6 e 7%). No entanto, apesar destes valores serem menores, ao comparar a quitinase ChiMaC4 com todas as outras 22 quitinases preditas, os valores de identidade são ainda menores do que 6%. Estes dados suportam a classificação destas quatro quitinases como pertencentes ao subgrupo C.



**Figura 18 Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo C de *M. anisopliae* e de outros fungos.** As seqüências protéicas das quitinases foram obtidas do banco de dados do NCBI e BROAD Institute. Árvores filogenéticas das quitinases foram realizadas no software Mega 4.1, utilizando *Neighbour Joining* (1.000 bootstraps), após alinhamento no software ClustalX2. As quitinases de *M. anisopliae* estão indicadas nos retângulos.

As três quitinases de *M. anisopliae* do novo subgrupo D possuem representantes em diversos outros fungos, incluindo a quitinase chi18-15 de *H. jecorina*. As quitinases ChiMaD2 e D3 apresentam-se filogeneticamente mais próximas entre si do que com a quitinase ChiMaD1. Seidl (2008) comenta que um grupo de proteínas apenas similares a quitinases também é encontrado em fungos e de acordo com a descrição realizada pela autora as quitinases aqui classificadas pertenceriam a esta classe de proteínas. No entanto, apesar de se agruparem separadamente na árvore filogenética da Figura 12 (e no Anexo1), o domínio GH18 das glicosil hidrolases, assim como outros motivos conservados em quitinases estão presentes nas ChiMaDs, como pode ser observado no Anexo 2, em um alinhamento entre todas as quitinases previstas para *M. anisopliae*.

Além disso, as quitinases deste subgrupo apresentam valores de identidade e similaridade com as outras 20 quitinases preditas maiores do que as quitinases do subgrupo C apresentam. Este fato sugere que as quitinases do subgrupo D são mais próximas, de maneira geral, dos outros membros desta família de proteínas do que as quitinases do subgrupo C, as quais não são questionadas por Seidl (2008) quanto a sua classificação como quitinases. Entre si, quitinases do subgrupo D apresentam valores de identidade entre 8 e 18% e de similaridade entre 16 e 29%.



**Figura 19. Filogenia das quitinases da família 18 do subgrupo D de *M. anisopliae* e de outros fungos.** As sequências protéicas das quitinases foram obtidas do banco de dados do NCBI e BROAD Institute. Árvores filogenéticas das quitinases foram realizadas no software Mega 4.1, utilizando *Neighbour Joining* (1.000 bootstraps), após alinhamento no software ClustalX2. As quitinases de *M. anisopliae* estão indicadas nos retângulos.

De maneira geral, as 23 quitinases de *M. anisopliae* apresentam variações amplas de identidade e de similaridade entre seus membros. As duas quitinases mais próximas apresentam 79 % de identidade e as duas quitinases mais distantes apresentam apenas 2% de identidade. Dentro dos subgrupos estes valores são, logicamente, maiores e ao comparar quitinases de diferentes subgrupos estes valores são baixos. Um dos motivos para valores tão baixos entre enzimas da mesma família é o tamanho muito

divergente entre elas. Por exemplo, a menor identidade é encontrada entre uma quitinase da família C que possui 1.370 aminoácidos e outras quitinases que apresentam em torno de 300 aminoácidos.

#### **4.5. PERSPECTIVAS**

- Realizar ensaios de RT-PCR para confirmar os dados oriundos das análises *in silico* (éxons, íntrons, região 5'UTR), e detectar a expressão dos transcritos de quitinases em diferentes tipos celulares.
- Analisar a região promotora dos genes que codificam as quitinases preditas para estudar a regulação desta família de proteínas.
- Selecionar as quitinases para estudar a função de cada subgrupo em *M. anisopliae*, através de deleção/superexpressão/fusão com GFP.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

O fungo filamentosso *M. anisopliae* é um agente biocontrolador amplamente utilizado em programas de contenção de pestes, as quais abrangem desde pragas da agricultura e da pecuária a vetores de doenças humanas. Aliado ao fato de ser um organismo modelo para o estudo de sua interação com seus hospedeiros, este fungo apresenta um potencial enorme para desenvolvimento de linhagens melhoradas para aplicação em controle biológico.

Este potencial é continuamente confirmado na literatura, juntamente com o fato que formulações contendo este microrganismo apresentarem limitações na sua aplicação evidenciando ainda a necessidade de melhorias no sistema. O conhecimento detalhado da biologia molecular e celular deste fungo está sendo ampliado justamente com o intuito de sobrepujar tais limitações através da caracterização de genes e proteínas fundamentais na infecção, na esporulação e na adaptação ao ambiente. Alguns avanços são alcançados pela combinação de estudos básicos da biologia molecular e genômica de patógenos com o desenvolvimento de técnicas que permitam aumentos na expressão gênica e o uso de genes que codificam proteínas que possam aperfeiçoar a eficácia dos agentes biocontroladores (ST. LEGER & WANG, 2009; SCHRANK & VAINSTEIN, 2010).

A utilização da toxina da leguminosa *Canavalia ensiformis*, Jaburetox-2Ec, é uma alternativa para o desenvolvimento de linhagens melhoradas para o biocontrole. Primeiramente, esta toxina parece ser responsável por um mecanismo eficiente de defesa das plantas contra insetos, sendo que sequências como Jaburetox-2Ec e pepcanatox estariam presentes nas ureases pró-toxinas. Além disso, Jaburetox-2Ec apresenta atividade tóxica efetiva em concentrações tão pequenas quanto 0,01% (w/w) em relação ao peso do inseto. Além disso, já foi comprovado que Jaburetox-2Ec não apresenta efeitos tóxicos quando injetado em camundongos, sugerindo não ser tóxico para mamíferos (MULINARI *et al.*, 2007).

Entretanto, nesta primeira tentativa de expressar Jaburetox-2Ec em *M. anisopliae*, o peptídeo formou agregados que são descritos como formas inativas do peptídeo. Estas formas inativas são induzidas quando o peptídeo é estocado a 4°C por

períodos de tempo superiores a semanas (BARROS *et al.*, 2009). Considerando que a detecção de Jaburetox-2Ec foi realizada neste trabalho após liofilização da amostra, é possível que esse tratamento tenha induzido a formação de agregados. Para excluir esta possibilidade e testar a agregação do peptídeo na fração intracelular de *M. anisopliae*, um novo experimento deve ser realizado que exclua manipulações que possam levar a formação de agregados.

No caso de Jaburetox-2Ec continuar ativo após ser expresso em *M. anisopliae*, é importante desenvolver uma linhagem que secrete este peptídeo. A produção da toxina no meio extracelular aceleraria o contato com o hospedeiro e diminuiria o tempo necessário para a morte do hospedeiro. Preferencialmente a expressão controlada da toxina induzida pelo contato com a hemolinfa tornaria o processo muito efetivo. Com este intuito, a região promotora e o peptídeo sinal da trealase ácida de *M. anisopliae* foram isolados e estão sendo estudados. Este gene tem a sua expressão induzida por trealose presente na hemolinfa. Após a confirmação de que estes elementos reguladores isolados permitirão a expressão e a secreção de proteínas na condição de indução esperada (presença de trealose), será construída uma linhagem que apresenta a capacidade de secretar peptídeos tóxicos na hemolinfa dos hospedeiros.

Durante a infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros, é conhecido que a etapa inicial de adesão e penetração ocorre num período de até 24h. Após esta etapa o fungo se desenvolve na hemolinfa do hospedeiro até a sua extrusão, de 5 a 7 dias após o início da infecção. Este fato demonstra que a capacidade de penetração e dissolução da cutícula do hospedeiro é muito eficiente e, em contraponto, as etapas seguintes são mais demoradas. Desta maneira, é um objetivo lógico tentar diminuir este tempo para que os insetos não continuem causando danos. Desta maneira, a expressão de Jaburetox-2Ec nesta segunda etapa diminuiria o tempo necessário para matar os hospedeiros, potencializando a ação de *M. anisopliae*.

Ainda, deve ser considerado que o período de tempo em que ocorrem a adesão e penetração de *M. anisopliae* pode ser diferente entre os diferentes hospedeiros. É provável que a penetração através da cutícula de certos hospedeiros seja mais demorada do que outros. Desta forma, o desenvolvimento de linhagens que promovam o controle eficiente de pragas pode ser alcançado com a combinação da otimização das duas etapas principais: a superexpressão de enzimas que hidrolisam a cutícula (como as quitinases, por exemplo) e a expressão de toxinas na hemolinfa dos hospedeiros.

O grande número de quitinases encontrado em *M. anisopliae* demonstra a complexidade do sistema quitinolítico deste fungo. Ainda, o fato de existirem 23 enzimas que potencialmente apresentam o mesmo tipo de atividade sobre o mesmo substrato pode sugerir redundância funcional destas enzimas. A redundância funcional (substituição completa ou parcial de uma função bioquímica/fisiológica de uma dada proteína por outro produto gênico) representa um obstáculo para a elucidação da função gênica já que pode resultar no mascaramento de um fenótipo mutante. Entretanto, alguns estudos de regulação destas enzimas demonstram que o mecanismo de indução/repressão por fontes de carbono (glicose, quitina, N-acetilglicosamina) não é exatamente igual para todos os membros desta família de proteínas (BARRETO *et al.*, 2004; SEIDL *et al.*, 2005 e 2008; DUO-CHUAN, 2006). Inclusive, já foram descritas quitinases que apresentam expressão constitutiva. Estes dados sugerem que se há redundância funcional nestas enzimas, é provável que não seja aplicável a todos os membros. A classificação das quitinases em subgrupos (A, B, C e D) não necessariamente implica que exista uma separação funcional relacionada a estes subgrupos. Mais provavelmente a função destas enzimas deve estar relacionada com a sua localização subcelular final do que com a presença ou ausência de domínios de ligação a substrato como ChBD, CBD e LysM. Entretanto, mesmo em organismos que apresentam um grande número de quitinases, como *M. anisopliae*, a supressão de um único destes genes de quitinases (gene *chi2*) pode interferir com a atividade do fungo (BOLDO *et al.*, 2009). Portanto a hipótese de redundância destas enzimas deve ser melhor considerada.

A estrutura dinâmica que caracteriza a parede celular dos fungos apresenta tanto uma função protetora quanto uma função agressora (LATGÉ, 2007). Estas duas funções estão relacionadas a atividade de quitinases, as quais além de remodelarem essa barreira protetora conforme adaptações necessárias, também dissolvem substratos quando secretadas no hábitat. A própria rigidez da parede celular confere a capacidade de penetração em substratos insolúveis. O ciclo de vida dos fungos depende de muitas alterações morfológicas em diversos tipos celulares como: tubo germinativo, formação de esporos, formação de apressório, formação de blastosporos, entre outros. Em cada um destes processos de diferenciação celular a parede celular rígida deve ser remodelada e, portanto a quitina presente deve sofrer alteração por ação de quitinases. Esses fatos exemplificam a complexidade do sistema quitinolítico em fungos e a

necessidade de novos estudos que esclareçam o papel desta família de proteínas. Essa complexidade de processos celulares pode estar diretamente relacionada a diversidade das quitinases.

A capacidade defensiva do exoesqueleto dos insetos é óbvia e eficaz já que apenas um grupo de entomopatógenos, os fungos, adquiriu a habilidade de penetrar ativamente esta barreira. Os outros principais grupos de microrganismos patógenos de insetos, as bactérias e vírus, estão restritos a invasão pelo canal alimentar ou por rupturas casuais da cutícula (CHARNLEY & ST. LEGER, 1991). Desta forma, é lógico destacar a importância da atuação destas enzimas no mecanismo de infecção de fungos entomopatógenos, os quais podem ser manipulados de maneira a superexpressarem quitinases-fatores de virulência.

As predições realizadas neste trabalho e analisadas em comparações com as quitinases de outros organismos indicam possíveis relações funcionais, no entanto é importante ressaltar a necessidade de confirmações experimentais que determinem a função exata de cada quitinase. Desta forma, serão escolhidas como alvo de estudos próximos algumas das quitinases de *M. anisopliae* que apresentaram potencial de interesse para o grupo.

## 6. CONCLUSÕES

- A agrotransformação de *M. anisopliae* permitiu o isolamento de 156 colônias fúngicas resistentes a glifosinato de amônio. Quatro transformantes analisados continham o *cassette* para expressão de Jaburetox-2Ec e a marca de resistência.
- Análises por *Western blot* indicaram a possível formação de agregados do peptídeo Jaburetox-2Ec. De acordo com Barros *et al.*(2009) a formação destes agregados pode reduzir a atividade inseticida.
- A sequência correspondente ao gene da trealase ácida de *M. anisopliae* E6 foi analisada *in silico* e a região promotora e o peptídeo sinal contidos neste gene foram isolados através da técnica de Genome Walking.
- Foram identificadas 23 quitinases preditas pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases através de biomineração realizada no genoma de *M. anisopliae* E6. As proteínas preditas foram classificadas em quatro grupos filogenéticos, A, B, C e D.
- Não foram detectadas quitinases pertencentes a família 19 das glicosil hidrolases, comumente presentes em plantas, no genoma de *M. anisopliae* E6.
- Propomos a criação de um novo subgrupo na família das quitinases GH18, o subgrupo D, composto de três quitinases sem íntrons, as quais não se agrupam com os outros subgrupos conhecidos e apresentam similaridade com proteínas ortólogas bacterianas.
- Dentre as 23 quitinases preditas, 18 apresentaram peptídeos sinal preditos pela ferramenta SignalP, indicando a importância dessas proteínas na via de secreção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, JD. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029–2035, 2004.
- ALMEIDA, JEM., BATISTA FILHO, A., SANTOS, AS. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom.:Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. *Arquivos do Instituto de Biologia* 70(1): 101–103, 2003.
- ANSARI, MA., SHAH, FA., TIRRY, L., MOENS, M. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control* 39: 453–459, 2006.
- AQUINO, ACMM., PEIXOTO-NOGUEIRA, SC., JORGE, JA., TERENCE, HF., POLIZELI, MLTM. Characterisation of an acid trehalase produced by the thermotolerant fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: Biochemical properties and immunochemical localization. *FEMS Microbiology Letters* 251: 169–175, 2005.
- ARRESE, EL., & SOULAGES, JL. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207–25, 2010.
- ARRUDA, W., LUBECK, I., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 37: 231–244, 2005.
- ARVAS, M., KIVIOJA, T., MITCHELL, A., SALOHEIMO, M. USSERY, D., PENTTILA, M., OLIVER, S. Comparison of protein coding gene contents of the fungal phyla Pezizomycotina and Saccharomycotina. *BMC Genomics* 8(325), 2007.
- BAKER, GL., MILNER, RJ., LUTTON, GG., WATSON, DM. Preliminary field trial on the control of *Phaulacridium vittatum* (Sjostetd) (Orthoptera: Acrididae) populations with *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycetina: Hyphomycetes). *Journal of the Australian Entomological Society* 33: 190–192, 1994.
- BARATTO, CM., SILVA, MV., SANTI, L., PASSAGLIA, LMP., SCHRANK, IS., VAINSTEIN, MH., SCHRANK, A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology* 49:723–726, 2003.
- BARATTO, CM., DUTRA, V., BOLDO, JT., LEIRIA, LB., VAINSTEIN, MH., SCHRANK, A. Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current Microbiology* 53:217–221, 2006.
- BARRETO, CC., STAATS, CC., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology* 48:102–107, 2004.
- BARROS, PR., STASSEN, H., FREITAS, MS., CARLINI, CR., NASCIMENTO, MAC., FOLLMER, C. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794: 1848–1854, 2009.

- BARSON, G, RENN, N., BYWATER, AF. Laboratory Evaluation of Six Species of Entomopathogenic Fungi for the Control of the House Fly (*Musca domestica* L.), a Pest of Intensive Animal Units. *Journal of Invertebrate Pathology* 64(2): 107–113, 1994.
- BATEMAN A, BYCROFT M. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound Lytic Murein Transglycosylase D (MltD). *Journal of Molecular Biology* 299: 1113–1119, 2000.
- BISCHOFF, JF., REHNER, SA., HUMBER, RA. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101(4): 512–530, 2009.
- BITTENCOURT, SET., CASTRO, LA., BAO, SN., SCHRANK, A., FARIAS, SE., VAINSTEIN, MH. Purification and ultrastructural localization of a copper–zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. *Research in Microbiology* 155: 681–687, 2004.
- BJELLQVIST, B., HUGHES, GJ., PASQUALI, Ch., PAQUET, N., RAVIER, F., SANCHEZ, JCh., FRUTIGER, S., HOCHSTRASSER, DF. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14: 1023–1031, 1993.
- BJELLQVIST, B., BASSE, B., OLSEN, E., CELIS, JE. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15: 529–539, 1994.
- BLANDFORD, S. & THOMAS, MB. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78(1): 1–8, 2001.
- BOGO, MR., ROTA, CA., PINTO JR, H., CAMPOS, M., CORREA, CT., VAINSTEIN, MH., SCHRANK, A. A Chitinase Encoding Gene (*chit1* Gene) from the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and Characterization of Genomic and Full-Length cDNA. *Current Microbiology*, 37(4): 221–225, 1998.
- BOLDO, JT., JUNGES, A., AMARAL, KB., STAATS, CC., VAINSTEIN, MH., SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics* 55:551–560, 2009.
- BOLDO, JT., AMARAL, KB., JUNGES, A., PINTO, PM., STAATS, CC., VAINSTEIN, MH., SCHRANK, A. Evidence of alternative splicing of the *chi2* gene from *Metarhizium anisopliae*. Artigo aceito para publicação na revista *Gene*, 2010.
- BOUCIAS, DG. & PENDLAND, JC. Attachment of mycopathogens to cuticle - The initial event of mycoses in arthropod hosts. In: Cole, GT & Hoch, HC. (Eds). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, Plenum Press, NY, 1991.
- BRAUN, EL., HALPERN, AL., NELSON, MA., NATVIG, DO. Large scale comparison of fungal sequence innovation in *Neurospora crassa* and gene loss in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Research* 10: 416–430, 2000

- BRIDGE, PD., PRIOR, C., SAGBOHAN, J., LOMER, CJ., CAREY, M., BUDDIE, A. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* form locust and grasshoppers. *Biodiversity and Conservation* 6: 177–189, 1997.
- BROGDEN, KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3:238–50, 2005.
- BUSTILLO, AE., BERNAL, MG., BENAVIDES, P., CHAVES, B. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Florida Entomologist* 82:491–498, 1999.
- BUTLER, AR.; O'DONNELL, RW.; MARTIN, VJ.; GOODAY, GW.; STARK, MJR. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *European Journal of Biochemistry* 199: 483–488, 1991.
- CARLINI, CR., OLIVEIRA, AEA., AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J., WELLS, MA. Biological Effects of Canatoxin in Different Insect Models. Evidence for a Proteolytic Activation of the Toxin by Insect Cathepsin like Enzymes.. *Journal of Economic Entomology* 90: 340–348, 1997.
- CARSOLIO, C., GUTIERREZ, A., JIMENEZ, B., VAN MONTAGU, M., HERRERA-ESTRELLA, A. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 10903–10907, 1994.
- CHAPMAN, RF. Circulatory system, blood and immune systems. In: *The Insects - Structure and Function*. Cambridge University Press, 1998.
- CHARNLEY, AK. Microbial pathogens and insect pest control. *Letters in Applied Microbiology* 12: 149–157, 1991.
- CHEN, C-C., ASHOK KUMAR, HG., KUMAR, S., TZEAN, S-S., YEH, K-W. Molecular Cloning, characterization, and expression of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*. *Current Microbiology* 55: 8–13, 2007.
- CHOQUER, M.; BECKER, HF.; VIDAL-CROS, A. Identification of two group A chitinase genes in *Botrytis cinerea* which are differentially induced by exogenous chitin. *Mycological Research* 111: 615 – 625, 2007.
- CLARKSON, JM & CHARNLEY, AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4(5): 197–203, 1996.
- CLERGEOT, PH., GOURGUES, M., COTS, J., LAURANS, F., LATORSE, MP, R'EGIS, P., THARREAU, D., NOTTEGHEM, JL. & LEBRUN, MH. PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 6963–6968, 2001.
- COLUSSI, PA., SPECHT, CA., TARON, CH. Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Applied Environmental Microbiology* 71: 2862–2869, 2005.

- DAHIYA, N., TEWARI, R., HOONDAL, GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(6): 773-782, 2005.
- DAVIES, G., & HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853–859, 1995.
- D'ENFERT, C. & FONTAINE, T. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Molecular Microbiology* 24(1): 203–216, 1997.
- DE FARIA, M. & WRAIGHT, SP. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237–256, 2007.
- DE GROOT, MJA., BUNDOCK, P., HOOYKAAS, PJJ., BEIJERSBERGEN, AGM. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16: 839–842, 1998.
- DE MORAES, CK., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. Regulation of Extracellular Chitinases and Proteases in the Entomopathogen and Acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology* 46: 205–210, 2003.
- DUAN, Z., SHANG, Y., GAO, Q., ZHENG, P., WANG, C. A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environmental Microbiology* 11(9): 2351–2360, 2009.
- DUARTE, RTD., STAATS, CC., FUNGARO, MHP., SCHRANK, A. VAINSTEIN, MH., FURLANETO-MAIA L., NAKAMURA CV., DE SOUZA W., FURLANETO, MC. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (3): 248–254, 2007.
- DUNKLER A, WALTHER A, SPECHT CA, WENDLAND J. *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genetics and Biology* 2005; 42: 935–947.
- DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345–360, 2006.
- DUTRA, V., NAKAZATO, L., BROETTO, L., SCHRANK, IS., VAINSTEIN, MH., SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology* 155: 245–251, 2004.
- EISENHABER, B., SCHNEIDER, G., WILDPANER, M., EISENHABER, F. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Molecular Biology* 337(2): 243–53, 2004.
- EMANUELSSON, O., BRUNAK, S., von HEIJNE, G., NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2: 953–971, 2007.
- ENGLER, R. & ROGOFF, MH. Entomopathogens: Ecological Manipulation of Natural Associations. *Environmental Health Perspectives*, 14: 153–159, 1976.

- ENKERLI, J. GHORMADE, V., OULEVEY, C., WIDMER, F. PCR-RFLP analysis of chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 102(2): 185-188, 2009.
- FAN, Y., FANG, W., GUO, S., PEI, X., ZHANG, Y., XIAO, Y., LI, D., JIN, K., BIDOCHKA, MJ., PEI, Y. Increased Insect Virulence in *Beauveria bassiana* Strains Overexpressing an Engineered Chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 295-302, 2007.
- FANG, W., BIDOCHKA, MJ. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research* 110(10): 1165-1171, 2006.
- FANG, W., LENG, B., XIAO, Y., JIN, K., MA, J., FAN, Y., FENG, J., YANG, X., ZHANG, Y., PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 363-370, 2005.
- FANG, W., PAVA-RIPOLL, M., WANG, S., ST. LEGER, RJ. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 277-285, 2009.
- FANG, W., PEI, Y., BIDOCHKA, MJ. 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: 1017-1025, 2007.
- FERREIRA, AVB. & GLASS, NL. PCR from fungal spores after microwave treatment *Fungal Genetics Newsletter* 43: 25-26, 1996. (Editado por Fungal Genetics Stock Center; <http://www.fgsc.net/>)
- FERREIRA-DASILVA, CT., GOMBAROVITS, ME., MASUDA, H., OLIVEIRA, CM., CARLINI, CR. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44(4): 162-71, 2000.
- FILHO, AB., ALMEIDA, JEM., SANTOS, AS., MACHADO, LA., ALVES, SB. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.:Cercopidae) *Arquivos do Instituto Biológico São Paulo*, 70 (3): 309-314, 2003.
- FOLLMER, C., BARCELLOS, GBS., ZINGALI, RB., MACHADO, OLT., ALVES, EW., BARJA-FIDALGO, C., GUIMARÃES, JA., CARLINI, CR. Canatoxin, a toxic protein of jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal*, 360: 217-224, 2001.
- FOLLMER, C., REAL-GUERRA, R., WASSERMANN, GE., OLIVERA-SEVERO, D., CARLINI, CR. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 271: 1357-1363, 2004.
- FORMENT, JV., RAMÓN, D., MACCABE, AP. Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the *CrelloxP* system. *Current Genetics* 50: 217-224, 2006.

- FRAZZON, AP., VAZ, IS., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 94: 117–125, 2000.
- FREIMOSER, FM., HU, G., ST. LEGER, RJ. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. *Microbiology* 151: 361–371, 2005.
- FREIMOSER, FM., SCREEN, S., BAGGA, S., HU, G., ST. LEGER, RJ. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149: 239–247, 2003.
- FUXA, JR. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Annual Review of Entomology* 32: 225–251, 1987.
- GENG, J., PLENEFISCH, J., KOMUNIECKI, PR., KOMUNIECKI, R. Secretion of a novel developmentally regulated chitinase (family 19 glycosyl hydrolase) into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 124: 11–21, 2002.
- GEORGHIOU, GP., Overview of insecticide resistance. *ACS Symp. Ser.* 421, 18–41.1990. **apud** NICHOLSON, GM. Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* 49: 413–422, 2007.
- GILLESPIE, JP., BATEMAN, R. & CHARNLEY, AK. Role of Cuticle-Degrading Proteases in the Virulence of *Metarhizium* spp. for the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 128–137, 1998.
- GILLESPIE, JP; KANOST, MR; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611–643, 1997.
- GOODAY, GW., ZHU, WY., O'DONNELL, RW. What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiology Letters* 100:387–392, 1992.
- GOURGUES, M. SIMON, AB., LEBRUN, MH. & LEVIS C. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* 51: 619–629, 2004.
- HAJEK, AE. & ST. LEGER, RJ. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293–322, 1994.
- HALL, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98, 1999.
- HAWTIN, RE., ARNOLD, K., AYRES, MD., ZANOTTO, PMA., HOWARD, SC., GOODAY, GW., CHAPPELL, LH., KITTS, PA., KING, LA. & POSSEE, RD. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 212: 673–685, 1995.
- HE, M. & XIA, Y. Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings. *FEMS Microbiology Letters* 291: 127–135, 2009.

- HE, S., BYSTRICKY, K., LEON, S., FRANÇOIS, JM., PARROU, JL. The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. *FEBS Journal* 276: 5432–5446, 2009.
- HEDGE, RS. & BERNSTEIN, HD. The surprising complexity of signal sequences. *TRENDS in Biochemical Sciences* 31(10): 563–571, 2006.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280: 309–316, 1991.
- HILL, R. & SENDASHONGA, C. Conservation Biology, Genetically Modified Organisms, and the Biosafety Protocol. *Conservation Biology* 20(6): 1620–1625, 2006.
- HOLHS, T., MONZINGO, AF., BORTONE, K., ERNST, S., COX, R., ROBERTUS, JD. The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Protein Science* 9: 544–551, 2000.
- HONDA, Y., TANIGUCHI, H., KITAOKA, M. A reducing-end-acting chitinase from *Vibrio proteolyticus* belonging to glycoside hydrolase family 19. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 627–634, 2008.
- HSIANG, T & BAILLIE, DL. Issues in Comparative Fungal Genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 6(4):99–122, 2006.
- HU, G. & ST. LEGER, RJ. Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12): 6383–6387, 2002.
- INYANG, EN., MCCARTNEY, HA., OYEJOLA, B., IBRAHIM, L., PYE, BJ., ARCHER, SA., BUTT, TM. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research* 104(6): 653–661, 2000.
- JARROLD, SL; MOORE, D; POTTER, U; CHARNLEY, AK. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research*, 111(2): 240–249, 2007.
- JONGE, R & THOMMA, BPHJ. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* 17(4)151 – 157, 2009.
- JORGE, JA., POLIZELI, MLTM., THEVELEIN, JM., TERENCEZI, HF. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 154(2): 165–171, 1997.
- KAAYA, GP. & MUNYINYI, DM. Biocontrol Potential of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse Flies (*Glossina* spp.) at Developmental Sites. *Journal of Invertebrate Pathology* 66(3): 237–241, 1995.
- KANZOK, SM. & JACOBS-LORENA, M. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *TRENDS in Parasitology* 22(2): 49–51, 2006.
- KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases: regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8(3): 809–824, 2003.
- KERN, MF., MARASCHIN, SD., VOM ENDT, D., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH., PASQUALI, G. Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco

- plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:1933–1946, 2010.
- KERSHAW, MJ., MOORHOUSE, ER., BATEMAN, R., REYNOLDS, SE., CHARNLEY, AK. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 213–223, 1999.
- KLEMSDAL, SS., CLARK, JL., HOELL, IA., EIJSINK, VGH., BRUBERG, MB. Molecular cloning, characterization and expression studies of a novel chitinase gene (*ech30*) from the mycoparasite *Trichoderma atroviride* strain P1. *FEMS Microbiology Letters* 256: 282–289, 2006.
- KUPFER, DM., DRABENSTOT, SD., BUCHANAN, KL., LAI, H., ZHU, H., DYER, DW., ROE, BA., MURPHY, JW. Introns and Splicing Elements of Five Diverse Fungi. *Eukaryotic Cell* 3(5): 1088–1100, 2004.
- KURANDA, M. & ROBBINS, PW. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 19758–19767, 1991.
- KRUSZEWSKA, JS., PERLIŃSKA-LENART, U., GÓRKA-NIEĆ, W., ORŁOWSKI, J., ZEMBEK, P., PALAMARCZYK, G. Alterations in protein secretion caused by metabolic engineering of glycosylation pathways in fungi. *Acta Biochimica Polonia* 55(3): 447–456, 2008.
- KRYKBAEV, R., FITZ, LJ., REDDY, PS., WINKLER, A., XUAN, D., YANG, X., FLEMING, M., WOLF, SF. Evolutionary and biochemical differences between human and monkey acidic mammalian chitinases. *Gene* 452(2): 63–71, 2010.
- LACEY, CM., LACEY, LA., ROBERTS, DR. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52(1): 108–111, 1988.
- LARKIN, MA., BLACKSHIELDS, G., BROWN, NP., CHENNA, R., McGETTIGAN, PA., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, IM., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, JD., GIBSON, TJ., HIGGINS, DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948, 2007.
- LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., TRUJILLO-DE LA LUZ, A., MOLINA-OCHOA, J., REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O., PESCADOR AR., LÓPEZ-EDWARDS, M., ALUJA, M. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field trials. *Journal of Economic Entomology* 93(4): 1080–1084, 2000.
- LI, J., YING, S., SHAN, L., FENG, M. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(4): 975–984, 2009.
- LI, Z., WANG, C., XIA, Y. Isolation of two Locust protein targets of a protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 151–155, 2008.
- LIANG, Z-Q., LIU, A-Y., LIU J-L. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta Mycologica Sinica* 10: 257–262, 1991.

- LIU, ZH., YANG, Q., HU, S., ZHANG, JD., MA, J.. Cloning and characterization of a novel chitinase gene (*chi46*) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 241–252, 2008.
- LIU, Z-Y., LIANG, Z-Q., WHALLEY, AJS., YAO, Y-J., LIU, A-Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 178–182, 2001.
- LOMER, CJ., BATEMAN, RP., DENT, D., DE GROOTE, H., DOURO-KPINDOU, OK., KOOYMAN, C., LANGEWALD, J., OUAMBAMA, Z., PEVELING, R., THOMAS, M. Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers. *Agricultural and Forest Entomology* 1: 71–88, 1999.
- LONG, Z. & HUNTER, DM. Laboratory and field trials of Green Guard<sup>®</sup> (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*) (Orthoptera: Acrididae) in China. *Journal of Orthoptera Research* 14(1): 27–30, 2005.
- LORD, JC. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 19-23, 2005.
- LU, D., PAVA-RIPOLL, M., LI, Z., WANG, C. Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(3): 515–22, 2008.
- LUBECK, I., ARRUDA, W., SOUZA, BK., STANISÇUASKI, F., CARLINI, CR., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology* 1: 78–88, 2008.
- LUTZ, MP., WENGER, S., MAURHOFER, MO., DÉFAGO, G., DUFFY, B. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 447–455, 2004.
- LUZ, C., TIGANO, MS., SILVA, IG., CORDEIRO, CM., ALJANABI, SM. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(6): 839–46, 1998.
- MACHADO, LA. & FILHO, EB. Prática cultural associada ao controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate à broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle*. *Arquivos do Instituto Biológico São Paulo* 73(4): 439–445, 2006.
- MARANNINO, P., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C., DE LILLO, E., QUESADA-MORAGA, E. A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera;Buprestidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 93:210–213, 2006.
- MARCHLER-BAUER, A *et al.* CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research* 37(Database Issue): D205–D210, 2009. Lista completa de autores: [http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/37/suppl\\_1/D205](http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/37/suppl_1/D205).
- MCCREATH, KJ., SPECHT, CA., LIU, Y., ROBBINS, PW. Molecular cloning of a third chitinase gene (*CHT1*) from *Candida albicans*. *Yeast* 12, 501–504, 1996.

- MENEZ, A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* 36(11): 1557–1572, 1998.
- MENT, D., GINDIN, G., SOROKER, V., GLAZER, I., ROR, A., SAMISH, M. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(2): 132–139, 2009.
- MERZENDORFER, H. & ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology* 206: 4393–4412, 2003.
- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* 26: 177–185, 2008.
- MOCHI, DA., MONTEIRO, AC., DE BORTOLI, SA., DÓRIA, HOS., BARBOSA, JC. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in Soil with Different Pesticides. *Neotropical Entomology* 35(3): 382–389, 2006.
- MORANDI, MAB. & BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de plantas no Brasil. In: Morandi & Bettiol (Eds), Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- MORISSETTE, DC., SEGUIN, P., JABAHI-HARE, SH. Expression regulation of the endochitinase-encoding gene *sechi44* from the mycoparasite *Stachybotrys elegans*. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 1103–1109, 2006.
- MULINARI, F. Ureasas de *Canavalia ensiformis* e peptídeo inseticida derivado. Tese de doutorado, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- MULINARI, F., FREITAS-SILVA, MA., GROSSI-DE-SÁ, MF., MORAES, MG., KURTENBACH, E., CARLINI, CR. Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Patente. Depósito em 08/04/2004, no INPI-S, com o número 001120/RS, 2004.
- MULINARI, F; STANISCUASKI, F; BERTHOLDO-VARGAS, LR; POSTAL, M; OLIVEIRA-NETO, OB; RIGDEN, DJ; GROSSI-DE-SA, MF; CARLINI, CR. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28(10): 2042–2050, 2007.
- NAKAZATO, L., DUTRA, V., BROETTO, L., STAATS, CC., VAINSTEIN, MH., SCHRANK, A. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1a* homologous promoter. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 72(3): 521–528, 2005.
- NICHOLSON, GM. Fighting the global pest problem: Preface to the special *Toxicon* issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* 49: 413–422, 2007.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10 (1): 1–6, 1997.

- NOWIERSKI, RM., ZENG, Z., JARONSKI, S., DELGADO, F., SWEARINGEN, W. Analysis and Modeling of Time-Dose-Mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Paecilomyces* Isolates from Madagascar. *Journal of Invertebrate Pathology* 67(3): 236–52, 1996.
- NOVOTNY, V., BASSET, Y., MILLER, SE., WEIBLEN, GD., BREMER, B., CIZEK, L., DROZD, P. Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature* 416: 841–844, 2002.
- OHNO, T., ARMAND, S., HATA, T., MIKAIKIDOU, N., HENRISSAT, B., MITSUTOMI, M., WATANABE, T. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of Bacteriology* 178: 5065–5070, 1996.
- OLIVEIRA, M.A.S.; ALVES, S.T.; FIALHO, J.F. e JUNQUEIRA, N.T.V. Patogenicidade de Fungos entomógenos sobre o percevejo-de-renda da mandioca no Distrito Federal. *Comunicado Técnico-EMBRAPA Cerrados* 45: 1–4, 2001.
- ORLEAN, P. & MENON, AK. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *Journal of Lipid Research* 48: 993–1011, 2007.
- PAL, S., ST. LEGER, RJ., WU, LP. Fungal peptide destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 8969–8977, 2007.
- PATIL, RS., GHORMADE, VV., DESHPANDE, MV. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microbial Technology* 26:473–483, 2000.
- PAVA-RIPOLL, M., POSADA, FJ., MOMEN, B., WANG, C., ST. LEGER, R. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *Journal of Invertebrate Pathology* 99(2): 220–6, 2008.
- PEDRINI, N., CRESPO, R., JUAREZ, MP. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 124–137, 2006.
- PENG, G., XIE, L., HU, J., XIA, Y. Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenous cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization. *Current Genetics* 55: 263–271, 2009.
- PERRAKIS, A., TEWS, I., DAUTER, Z., OPPENHEIM, AB, CHET, I., WILSON, KS., & VORGIAS, CE. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3Å resolution. *Structure* 2: 1169–1180, 1994.
- PIRES-ALVES, M., GROSSI-DE-SÁ, MF., BARCELLOS, GBS., CARLINI, CR., MORAES, MG. Characterization and Expression of a Novel Member (JBURE-II) of the Urease Gene Family from Jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC] *Plant and Cell Physiology* 44(2): 139–145, 2003.
- QUESADA-MORAGA, R., SANTOS-QUIRÓS, P., VALVERDE-GARCÍA, SANTIAGO ÁLVAREZ, C. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of

- Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 87(1): 51–58, 2004.
- QUINTELA, ED. & ROBERTS, DW. Controle de *Chalcoedermus bimaculatus* (Boheman) (Coleoptera:Curculionidae) no solo com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 27, S/N 95–105, 1992.
- REESE, M.G. & EECKMAN, F.H. Novel Neural Network Algorithms for Improved Eukaryotic Promoter Site Recognition. In: The Seventh International Genome Sequencing and Analysis Conference, Hilton Head Island, South Carolina, 1995.
- ROBERTS, DW. World Picture of Biological Control of Insects by Fungi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87(3): 89-100, 1989.
- ROBERTS, DW. & ST LEGER, RJ. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54: 1–70, 2004.
- SAITO, A., OZAKI, K., FUJIWARA, T., NAKAMURA, Y., TANIGAMI, A. Isolation and mapping of a human lung-specific gene, TSA1902, encoding a novel chitinase family member. *Gene* 239: 325–331, 1999.
- SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425, 1987.
- SAKUDA, S., ISOGAI, A., MATSUMOTO, S., SUZUKI, A., KOSEKI, K. The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Letters* 27: 2475–2478, 1986.
- SALAMOV, A. & SOLOVYEV, V. Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Research* 10: 516–522, 2000.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- SANDELIN, A., ALKEMA, W., ENGSTROM, P., WASSERMAN, WW., LENHARD, B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research* 1:32(Database issue): D91–94, 2004.
- SANTI, L., SILVA, WOB., PINTO, AF., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. *Research in Microbiology* 160: 824–828, 2009.
- SANTI, L., SILVA, WOB., PINTO, AFM., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. *Metarhizium anisopliae* host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology* doi:10.1016/j.funbio.2010.01.006, 2010.
- SEYOUM, E., BATEMAN, RP., CHARNLEY, AK. The effect of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *The Journal of Applied Entomology* 126: 119–124, 2002.
- SCHOLTE, EJ., NG'HABI, K., KIKONDA, J., TAKKEN, W., PAAIJMANS, K., ABDULLA, S., KILLEEN, GF., KNOLS, BG. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science* 308:1641–1642, 2005.

- SCHRANK, A. & VAINSTEIN, MH. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* Article in Press, (doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.008)
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36–42, 2008.
- SEIDL, V., HUEMER, B., SEIBOTH, B., KUBICEK, CP. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal* 272: 5923–5939, 2005.
- SHAH, PA. & PELL, JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 13–423, 2003.
- SHIN, K-S., KWON, N-J., KIM, YH., PARK, H-S., KWON, G-S., YU, J-K. Differential Roles of the ChiB Chitinase in Autolysis and Cell Death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 8(5): 738–746, 2009.
- SIEBERT, P. D., CHENCHIK, A., KELLOGG, D. E., LUKYANOV, K. A. & LUKYANOV, S. A. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. 23:1087–1088, 1995.
- SILVA, WOB., SANTI, L., SCHRANK, A., VAINSTEIN, MH. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. *Mycological Research* [Epub ahead of print], 2009.
- SKROBEK, A., SHAH, FA., BUTT, TM. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioControl* 53: 361–373, 2008.
- SMALE, ST. & KADONAGA, JT. The RNA Polymerase II Core Promoter. *Annual Review of Biochemistry* 72: 449–79, 2003.
- SMALL, CN. & BIDOCHKA, MJ. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 109(3): 307–313, 2005.
- SOANES, DM., ALAM, I., CORNELL, M., WONG, HM., HEDELER, C., PATON, NW., RATTRAY, M., HUBBARD, SJ., OLIVER, SG., TALBOT, NJ. Comparative Genome Analysis of Filamentous Fungi Reveals Gene Family Expansions Associated with Fungal Pathogenesis. *PLoS ONE* 3(6): e2300: 1-15, 2008.
- SOSA-GMEZ, DR., MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 71(2): 115–120, 1998.
- SOUTHERN, JA., YOUNG, DF., HEANEY, F., BAUMGÄRTNER, W., RANDALL, RE. Identification of an Epitope on the P and V Proteins of Simian Virus 5 That Distinguishes Between Two Isolates with Different Biological Characteristics. *Journal of General Virology* 72: 1551–1557, 1991.
- SREE, KS. & PADMAJA, V. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Journal of Applied Entomology* 132: 68–78, 2008.

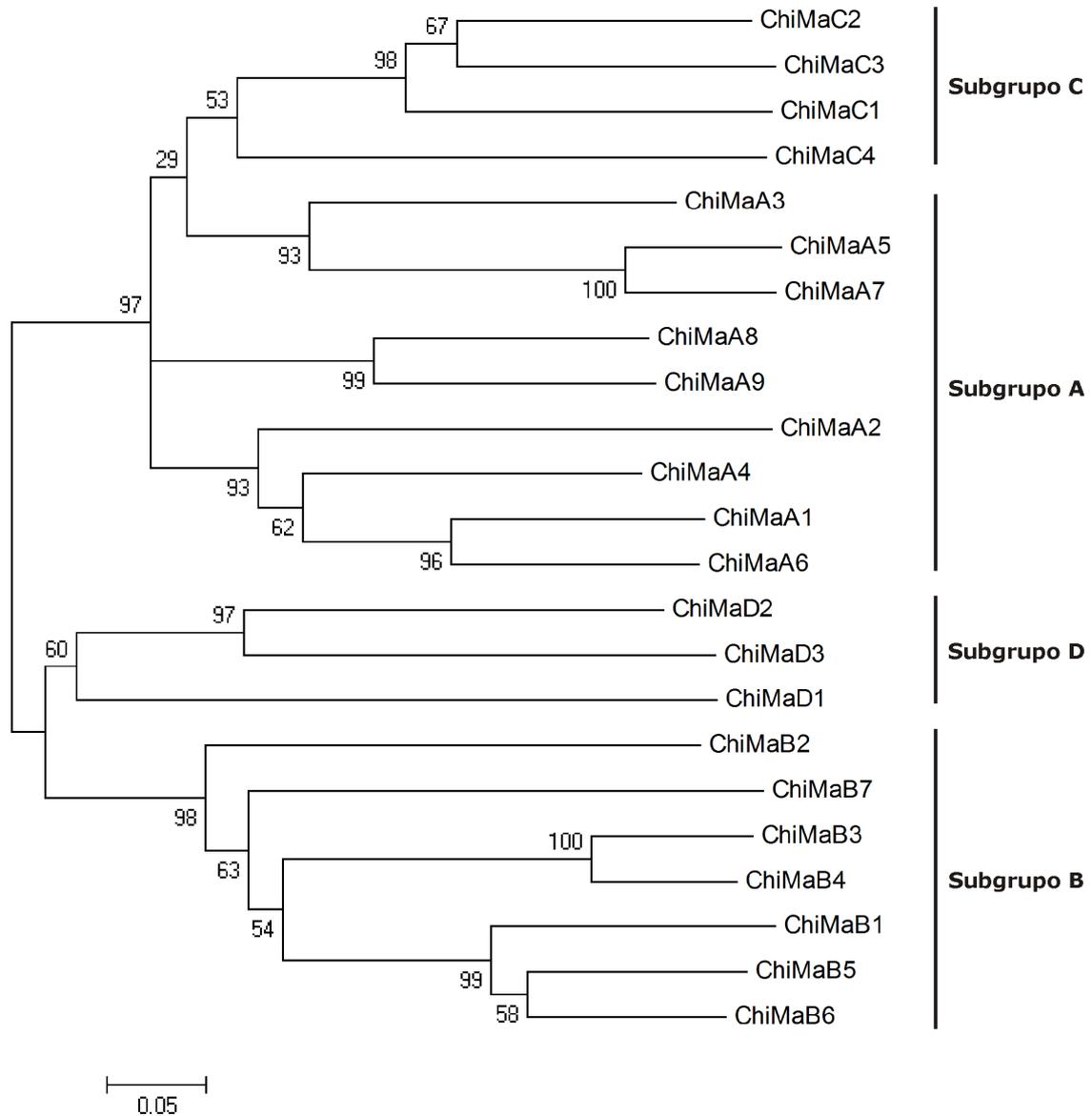
- SREE, KS., PADMAJA, V., MURTHY, YLN. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera:Noctuidae) larval stages. *Pest Management Science* 64: 119–125, 2008.
- ST. LEGER, RJ. *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions. In: Vurro, M. & Gressel, J. *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, Springer, New York, 179–204, 2007.
- ST. LEGER, RJ., BIDOCHKA, MJ. & ROBERTS, DW. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 313(1): 1–7, 1994.
- ST. LEGER, RJ., CHARNLEY, AK., COOPER, RM. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 253 (1): 221–232, 1987.
- ST. LEGER, RJ., JOSHI, L., BIDOCHKA, MJ., RIZZO, NW., ROBERTS, DW. Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3): 907–912, 1996a.
- ST. LEGER, RJ., JOSHI, L., BIDOCHKA, MJ., ROBERTS, DW. Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. *Mycological Research* 99 (9): 1034–1040, 1995.
- ST. LEGER, RJ; JOSHI, L., BIDOCHKA, MJ., ROBERTS, DW. Construction of a mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 6349–6354, 1996b.
- ST. LEGER, RJ; STAPLES, RC., ROBERTS, DW. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 81–84, 1993.
- STAATS, CC. Estudo Funcional de Genes do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Tese de doutorado, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- STAATS, C.C., JUNGES, A., FITARELLI, M., FURLANETO M.C., VAINSTEIN, M.H. e SCHRANK, A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 945–950, 2007.
- STADEN, R. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5: 233–241, 1996.
- STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DASILVA. C.T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M. e CARLINI, C.R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753–760, 2005.
- STANISÇUASKI, F., TE BRUGGE, V., CARLINI, CR. ORCHARD, I. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *Journal of Insect Physiology* 55: 255–263, 2009.

- STANKE, M., STEINKAMP, R., WAACK, S., MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 32: 309–312, 2004.
- STEINBERG, G. & PEREZ-MARTIN, J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology* 18(2): 61–67, 2007.
- SUNG, G-H., HYWEL-JONES, NL., SUNG, J-M., LUANGSA-ARD, JJ., SHERTHRA, B., SPATAFORA, JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 1–59, 2007.
- SVEDESE, VM., PORTELA-SILVA, APA., LOPES, RS., LUNA-ALVES LIMA, EA., ALBUQUERQUE, AC. Infectivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Zaprionus indianus* (Fig Fly) under Laboratory Conditions, *Arquivos do Instituto Biológico São Paulo* 3(1): 24–27, 2005.
- SYNSTAD, B., GASEIDNES, S., VAN AALTEN, DMF., VRIEND, G., NIELSEN, JE., EIJNSINK, VGH. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry* 271: 253–262, 2004.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599, 2007.
- TEFERA, T. & PRINGLE, KL. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 220–225, 2003.
- TEIXEIRA, VM.; SÁ, LAN., ROCHA, VF. Utilização de microorganismos entomopatogênicos no controle biológico de cigarrinha-das-pastagens (Homoptera:Cercopidae) no território portal da Amazônia. *Anais de Eventos da UFSCar*, 3: 1210–1211, 2007.
- TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, AC , HENNIG, M., DNKSTRA, BW. The 1.8Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *Journal of Molecular Biology* 262: 243–257, 1996.
- THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM, *et al.* Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology Genome Sequence of the Nematode. *Science* 282: 2012–2018, 1998.  
(Lista Completa dos autores disponível em: [www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/))
- TOMAZETTO, G., MULINARI, F., STANISÇUASKI, F., SETTEMBRINI, B., CARLINI, CR., AYUB, MAZ. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology* 41:821–827, 2007.
- TRUONG, N., PARK, S., NISHIZAWA, Y., WATANABE, T., SASAKI, T., ITOH, Y. Structure, Heterologous Expression, and Properties of Rice (*Oryza sativa* L.) Family 19 Chitinases. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry* 67(5): 1063–1070, 2003.
- UEDA, M., KOJIMA, M., YOSHIKAWA, T., MITSUDA, N., ARAKI, K., KAWAGUCHI, T., MIYATAKE, K., ARAI, M., FUKAMIZO, T. A novel type of family 19 chitinase from

- Aeromonas* sp. No.10S-24 - Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. *European Journal of Biochemistry* 270: 2513–2520, 2003.
- VAN AALTEN, DMF., KOMANDER, D., SYNSTAD, B., GÅSEIDNES, S., PETER, MG., EIJSINK, VGH. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exochitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(16): 8979–8984, 2001.
- VON HEIJNE, G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European Journal of Biochemistry* 133: 17–21, 1983.
- WALLIS, GLF., HEMMING, FW., PEBERDY, JF. Investigation of the glycosyltransferase enzymes involved in the initial stages of the N-linked protein glycosylation pathway in *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 91–98, 1999.
- WANG, C., DUAN, Z., ST. LEGER, RJ. The MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell* 7(2): 302–309, 2008.
- WANG, C., HU, G., ST. LEGER, RJ. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology* 42: 704–718, 2005.
- WANG, C. & ST. LEGER, RJ. Developmental and Transcriptional Responses to Host and Nonhost Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell* 4(5): 937–947, 2005.
- WANG, C. & ST. LEGER, RJ. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(17): 6647–6652, 2006.
- WANG, C. & ST. LEGER, RJ. The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. *Eukaryotic Cell* 6(5): 808–816, 2007a.
- WANG, C. & ST. LEGER, RJ. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nature Biotechnology* 25: 1455–1456, 2007b.
- WANG, K., WAYNE, D., BRUNAK, S. Analysis and prediction of gene splice sites in four *Aspergillus* genomes. *Fungal Genetics and Biology* 46(1): 14–18, 2009.
- WANG, Y-J. & YANG, Q. Cloning and Expression of a Novel Chitinase chi58 from *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris*. *Biochemical Genetics* 47: 547–558, 2009.
- WATTANALAI, R., WIWAT, C., TARTAR, A., BOUCIAS, DG. Chitinase gene of the dimorphic mycopathogen, *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 54–57, 2004.
- WEKESA, VW., MANIANIA, NK., KNAPP, M., BOGA, HI. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology* 36: 41–50, 2005.
- WESSELS, JGH. Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist* 14(4): 153–159, 2000.
- WYATT, GR. & KALF, GF. The Chemistry of Insect Hemolymph II: Trehalose and other carbohydrates. *The Journal of General Physiology* 40(6): 833–847, 1957.

- XIA, Y., CLARKSON, JM., CHARNLEY, AK. Trehalose hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 139–147, 2002.
- XIA, Y., DEAN, P., JUDGE, AJ., GILLESPIE, JP., CLARKSON, JM., CHARNLEY, AK. Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Insect Physiology* 46: 1249–1257, 2000.
- YAMAZAKI, H., TANAKA, A., KANEKO, J., OHTA, A., HORIUCHI, H. *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genetics and Biology* 45: 963–972, 2008.
- YAMAZAKI, H., YAMAZAKI, D., TAKAYA, N., TAKAGI, M., OHTA, A., HORIUCHI, H. A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* 51: 89–98, 2007.
- YANG, H., LI, Q., FAN, J., HOLLOMAN, WK., PAVLETICH, NP. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature* 433: 653–657, 2005.
- YODER, OC. & TURGEON, BG. Fungal genomics and pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* 4:315–321, 2001.
- ZDOBNOV, EM. & APWEILER, R. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17(9): 847–848, 2001.
- ZHANG, C. & XIA, Y. Identification of genes differentially expressed *in vivo* by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. *Current Genetics* 55: 399–407, 2009.
- ZHANG, WM., LI, TH., CHEN YQ., QU, LH. *Cordyceps campsosterna*, a new pathogen of *Campsosternus auratus*. *Fungal Diversity* 17: 239–242, 2004.
- ZHAO, H., CHARNLEY, AK., WANG, Z., YIN, Y., LI, Z., LI, Y. CAO, Y., PENG, G., XIA, Y. Identification of an Extracellular Acid Trehalase and Its Gene Involved in Fungal Pathogenesis of *Metarizium anisopliae*. *Journal of Biochemistry* 140: 319–327, 2006.
- ZHIOUA, E., BROWNING, M., JOHNSON, PW., GINSBERG, HS., LeBRUN, RA. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology* 83(5): 815–818, 1997.
- ZHU, Z., ZHENG, T., HOMER, RJ., KIM, Y., CHEN, NY., COHN, L., HAMID, Q., ELIAS, JA. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 304: 1678–1682, 2004.

## **ANEXOS**



**Anexo 1.** Árvore filogenética das quitinases preditas de *M. anisopliae* E6. As 23 quitinases são divididas entre os quatro subgrupos A, B, C e D.

A

ChiMaA1 -----T**P**VSA**P**DT**V**IG-K**H**AG**G**Y**V**NAV**I**FT**N**W**G**I**Y**-G**R**NY**Q**PA-----D**L**PA**S**Q**I**SH**V**LY**S**FL**N**LS-NN-----G**T**V**S**GD**S**W**A**D**I**DK**H**Y**P**ND**S**W**N**D**V**G-----NN**V**Y**G**CV**K**Q**L**Y**L**LL**K**KA**N** 98  
ChiMaA6 -----A**C**T**G**KK**N**S**G**Y**V**NAV**I**FT**N**W**G**TH**N**G**T**NF**Q**PA-----A**L**PA**P**Q**I**SH**I**N**Y**AF**N**LN**I**T**N**-----G**T**V**S**AD**P**VAD**H**ERR**Y**P**G**D**S**Q**N**K**S**D**T**-----AN**V**Y**G**AV**K**Q**L**F**L**LL**K**KA**N** 94  
ChiMaA4 -----M**S**ND**G**Y**R**T**V**AY**F**V**N**W**A**I**Y**-A**R**K**H**R**P**Q-----D**L**E**V**EN**L**T**H**V**L**Y**A**F**A**N**V**R**I**D**T**-----G**E**V**H**L**D**T**W**AD**H**I**H**W**E**D**S**W**N**D**T**G-----NN**I**Y**G**CL**K**Q**L**N**L**LL**K**KA**N** 88  
ChiMaA2 -----M**S**SH**S**R**P**R**K**S**R**I**A**T**S**V**A**R**V**M**T**NAV**I**F**S**NN**R**V**Y**Q**G**--D**T**PA-ML**N**-----Y**S**CV**N**R**V**Y**A**Y**A**S**V**G**S**D**G**G-----V**F**LS**D**E**W**AD**A**R**A**P-----I-----D**G**VO**G**AL**G**S**L**M**H**L**K**Q**R**H 92  
ChiMaA8 -----A**P**P**V**IG**Y**Y**P**AS**R**HT-----V**L**KD**I**D**L**S**G**-----Y**T**H**I**N**V**A**F**AL**P**-----D**E**K-----A**N**L**A**F**E**G**D**-----E**V**M**P**E**I**V**P**K**L**Q**E** 58  
ChiMaA9 -----A**N**V**L**V**G**Y**Y**P**T**W**K**HA**A**MS**N**-----M**D**LS**N**Y**T**H**V**N**V**A**F**A**I**P**H**E**N**G**S**-----L**A**F**E**G**D**T**F**M**D**K**L**V**P**-----K**L**Q**G** 57  
ChiMaA5 -----A**P**R**V**MY**F**D**Q**-W**H**K**T**T**P**P-----P**K**D-----V**T**A**G**V**N**Y**V**I**T**A**F**A**P**S-----T**F**E**N**S**G**S**Y**Q**P**-----F**M**PL**D**Q**V**R-----A**L**F**D** 58  
ChiMaA7 -----A**P**R**V**Y**F**D**Q**R**W**H**K**T**T**L**P**-----S**K**D-----V**T**A**G**V**N**Y**V**M**I**A**F**A**P**S-----T**A**F**N**W**D**S**Y**Q**P**-----F**M**PL**D**Q**I**R-----A**L**F**E** 59  
ChiMaA3 -----S**S**H**R**F**F**A**I**R**C**V**M**Y**L**T**G**-O**H**N**V**V**E**S-----E**P**E-----L**T**K**O**I**T**H**V**V**L**A**F**M**R**S-----D**V**F**N**S**D**O-**O**S**E**P**F**P**L**F**T**V**G**E**V**R-----E**K**F**H** 68  
ChiMaC1 **D**D**F**G**I**E**S**K**S**E**T**G**A**P**G**T**S**G-V**K**N-G**C**I**S**N**C**G**R**S**I**I**K**G--P**P**PD**T**K**I**N**I**A**I**F**E**A**W**N**H**K**R**P**C**L**T**-----M**D**V**I**Q**I**D**T**T**K**Y**S**H**I**H**F**A**F**A**E**V**T**R-----D**F**-----D**V**D**I**S**K**V**Q**E**Q**F**D**M**E**K**T**M 640  
ChiMaC2 **A**E**F**C**T**E**S**L**A**D**I**G**A**P**G**H**K**P**G**T**N**-G**C**I**S**N**C**N**M**N**I**I**R**S--P**E**PP**A**S**F**L**S**I**G**Y**F**E**G**Y**L**T**K**I**C**D**R**-----V**D**I**R**T**I**D**L**K**K**Y**T**H**I**H**F**A**F**A**T**V**T**A**N**-----T**F**-----D**V**N**M**G**P**L**N**Q**F**Y**F**Y**F**Q**L** 565  
ChiMaD2 -----M**P**P**I**P**P**H**K**H**P**L**R**L**I**Y**Y**O**T**H**H**T**P**S**G**E**H**I**S**V**L**P**L**L**T**R**P**-----S**I**S**L**T**H**L**I**L**A**A**C**H**I**N**A**S**P**S**Q**L**T**L**N**D**H**P**P**S**H**P**R**F**O**T**L**W**A**E**L**R**V**L**Q**A**S**G 85  
ChiMaD3 -----S**P**I**V**E**V**Y**T**I**P**L**R**L**V**V**Y**F**O**T**H**D**S**N**G**A**I**S-----M**L**P**L**I**K**D**K**S**I**A**L**T**H**I**I**S**S**F**H**V**Q**K**N**-----R**E**I**H**L**N**D**H**P**P**S**D**-----P**M**F**Y**T**L**W**N**E**T**R**I**M**K**E 84  
ChiMaB5 -----M**G**Q**S**V**A**Y**W**G**Q**NG-----G**G**I**E**N**N**D-----L**A**H**Y**C**S**N**G**A**G**I**D**V**V**L**S**F**L**E**F**Q**Y**-----G**S**G**N**R**I**P-----F**G**N**I**G**Q**S**C**T**I**V**S**S**G**E**Q**-----Q**C**E**A**L**A**A**E**T**C**K**S**- 81  
ChiMaB6 -----A**P**R**A**R**P**A**G**A**Q**N**V**V**Y**W**G**Q**NG**-----G**G**V**E**N**N**D-----L**A**A**Y**C**A**S**S**G**I**D**I**V**L**A**F**L**Y**Q**Y**-----G**N**G**H**T**I**P-----S**G**T**I**G**Q**S**C**Y**I**A**S**G**E**Q-----N**C**D**A**L**A**K**A**I**D**T**C**K**T**- 88  
ChiMaB1 -----V**P**L**T**D**K**I**S**V**K**P**R**Q--A**P**A**Q**N**V**V**Y**W**G**Q**NG**-----G**G**T**I**E**N**N**D**-----L**A**A**Y**C**P**N**S**G**I**D**V**L**V**A**F**L**Y**Q**F**-----G**N**G**G**N**I**P-----S**G**T**I**G**Q**S**C**Y**I**S**T**S**G**Q**Q**-----N**C**E**A**L**T**A**I**H**T**C**Q**S- 95  
ChiMaB3 -----G**F**N**G**S**S**H**K**N-----I**A**V**Y**W**G**Q**N**S--F**G**Q**S**G**S**G**N**V**Q**Q**G**-----L**A**H**Y**C**E**N-**A**D**M**G**I**P**I**A**F**M**N**G-----I**S**P**I**T**I**N**F**A**N**A**G**D**K**D**K**F**P**G**N**S--N-----L**L**K**C**P**E**I**E**K**D**I**K**T**C**Q**T**K 90  
ChiMaB4 -----G**F**N**S**G**S**G**K**N**A**K**R**T**I**K**A**V**R**L**N**S**A**W**I**T**A**P**V**G**N**-T**N**P**L**-L**D**S**Q**-M**L**T**L**L**S**L**D**-T**E**I**D**V**I**P**V**A**F**M**N**G-----I**P**P**I**T**I**N**F**A**N**A**G**D**N**C**T**A**F**P**S**N**S**--N-----L**L**S**C**P**Q**I**E**A**D**I**K**S**C**Q**A**T 105  
ChiMaC3 **P**A**H**C**D**V**H**R**P****F**G**G**G**P**G**S**R**K**K**G**Y**Q**N**T**C**V**S**N**C**G**R**K**K**I**K--L**N**S**G**P**P**A**A**F**O**R**I**G**Y**E**A**F**A**S**K**R**D**C**L**H**L**K**A**K**H**A**N**-----T**D**G**S**Y**T**H**I**W**G**F**A**D**I**D**V**T**W**K**P**-----V**I**N**D**G**K**D**Q**W**E**D**F**K**L** 592  
ChiMaB2 -----A**P**A**E**R**N**A**S**R**H**K**L**I**V**Y**W**A**E**D**D**I**T**L**D**D-----V**C**N**D**S**S**V**D**V**N**L**A**F**L**S**H**F**F**S**N**G-----G**Y**P**K**M**S**I**G**N**L**G**G**P**S**R**A**Q**K**K**A**G-----A**T**G**L**Q**D**G**S**S**L**S**I**K**N**Q**S**- 89  
ChiMaB7 -----Y**N**G**O**T**G**-----G**R**F**L**R**D**I**C**D**S**G**V**K**A**T**S**F**I**N**S**P**E**H**D**G**Y**P**G**S**N**F**G**-----A**N**C**A**G**E**V**Y**T**N**T**D**G**K**K**T**K-----L**L**S**A**C**S**F**I**Q**R**D**I**Y**Y**Q**S**K 77  
ChiMaC4 **E**E**F**C**K**G**E**V**K**R**P**S**C**S**V**D**T**P**V**D**R**-----V**I**G**Y**E**G**W**A**I**S**N**R**G**C**N**A**L**R**P**E**E**I**P-----Y**G**A**T**H**L**I**F**S**F**A**T**I**N**P**K**T**F**E**V**S-----P**D**N**Y**K**I**E**D**M**M**E**R**I**G**T**M**K**L**L 135  
ChiMaD1 -----Q**N**E**T**C**A**T**K**G**R**P**A**G**K**V**L**Q**G**W**E**N**W**D**G**A**K**N**G**V**H**P**P**L**G**-----W**I**P**I**Q**A**R**I**R**Q**G**Y**N**V**I**S**A**A**F**V**I**L**P**D**G-----T**A**L**W**E**D**G**M**D**A**N-----V**K**V**A**T**P**A**E**M**C**Q**A**K 87  
..... 610..... 620..... 630..... 640..... 650..... 660..... 670..... 680..... 690..... 700..... 710..... 720..... 730..... 740..... 750

ChiMaA1 R**N**M-K**L**M**L**S**I**G**G**W**I**W-----S**T**N--F**P**A**A**A**S**T**A**A**T**R**S**N**F**A**K**--S**A**V**T**I**M**K**D**W-----G**F**D**G**I**D**V**D**W**Y**P-----A**D**--D**V**G-----A**T**N**M**V**L**L**L**Q**A**V**R**D**E**L**D**A**Y**A**A**K**F**A--O**G**Y**H**F**O**L**S**I**A**A-----P**A**G**P**A**N**N**K**L**H**L 203  
ChiMaA6 R**H**M-K**L**L**S**I**G**G**W**I**W**-----S**Q**N**P**A**F**A**I**V**A**A**S**N**A**T**R**L**T**F**A**R--S**A**V**E**L**V**R**D**W-----G**F**D**G**I**D**L**D**W**Y**P-----Q**D**--A**K**G-----A**A**D**M**V**L**L**L**Q**A**L**R**D**E**L**D**A**Y**A**A**R**S**A--P**G**Y**R**F**O**L**T**I**A**S-----P**A**G**A**A**A**N**K**L**Q**L 201  
ChiMaA4 R**N**L-K**V**L**S**I**G**G**W**I**Y**-----S**A**N--F**K**N**P**A**S**T**P**Q**G**R**E**T**F**A**K**--S**C**V**E**L**L**K**N**L-----G**F**D**G**I**D**I**D**W**Y**P-----Q**N**--P**E**E-----A**R**N**Y**V**E**L**L**A**A**V**R**Q**E**L**D**A**Y**A**A**K**C**V--D**N**Y**H**F**E**L**T**V**A**C-----P**A**G**P**N**N**E**K**L**E**I 193  
ChiMaA2 **P**H**L**-Q**V**V**L**S**I**G**G**G**A**C-----S-----N**L**F**P**M**V**A**G**N**A**H**L**R**E**N**L**A**R**--S**A**L**G**L**V**E**A**S-----G**L**D**G**I**D**I**A**W**Y**P-----C**S**V**E**Q**N**D**F**L**A**L**L**A**T**V**R**L**H**P**E**-----D**R**Y**I**L**T**A**A**L**P**-----A**T**K**I**V**L**Q**F**I**D**F 189  
ChiMaA8 K**G**T-K**V**L**V**S**I**G**G**W-----T**G**S**A**F--F**S**N**I**T**E**G**M**R--E**T**F**A**-N--N**V**I**E**L**M**K**K**H-----N**L**D**G**I**D**F**D**W**Y**P**G**Q**A**G**S**P**C**N**F**F**D**E**Q**N-----D**T**N**N**F**L**A**F**L**Q**M**R**S**K**V**N**E**L**G-----P**D**K**L**I**T**L**A**V**L**T**R**P**F**A**G**-----P**G**G**E**-----D**V** 167  
ChiMaA9 A**G**S-K**V**L**V**S**I**G**G**W**S**G-----S**A**K**F**S**S**I**T**K**D**AL**S**G**A**L**T**K--S**I**I**D**M**M**T**K**Y-----K**L**D**G**I**D**I**D**W**Y**P**G**R**K**G**S**D**C**N**V**D**E**Q**N**-----D**A**T**N**F**L**K**Y**L**N**D**L**R**A**K**M**D**E**A**F**G**K**G-----K**L**I**T**L**A**L**R**I**Q**P**F**D**G**-----P**G**G**K**-----D**V** 168  
ChiMaA5 K**G**T-K**V**C**M**A**I**G**G**W**D**-----T**S**G**F**S**I**G**A**E**T**T**R**K**T**Y**A**K--N**V**A**T**A**L**T**I**L-----G**Y**D**C**I**D**V**D**W**Y**P**G**G**N**G**D**Y**K**Q**I**P**N**D**K**V**S**E**I**E**T**Y**A**L**L**L**Q**E**I**K**A**A**I**G-----E**K**E**L**S**I**A**V**P**G**R**E**G**D**-----M**I**A**F**T**A**E**Q**V 169  
ChiMaA7 R**G**T-K**V**C**M**A**I**G**G**W**D**-----T**S**G**F**S**A**G**A**V**D**E**S**S**R**K**R**Y**A**K--N**V**A**E**A**V**D**R**L-----G**Y**D**C**V**D**V**D**W**Y**P**G**G**N**G**D**Y**K**Q**I**E**N**E**Q**R**V**S**E**I**E**T**Y**P**L**L**L**T**E**I**K**A**A**I**G**-----R**H**E**L**S**I**A**V**P**G**R**E**A**D**-----M**I**A**F**T**A**E**Q**V 170  
ChiMaA3 H**E**T-K**V**M**V**A**V**G**G**W**D**-----S**K**G**F**E**E**A**N**K**D**A**K**S**R**K**R**W**C**E--N**V**R**K**M**I**D**L**I-----G**A**D**G**V**D**I**D**W**Y**P**G**G**N**R**D**D**Y**K**I**P**E**N**R**R**K**W**E**I**E**A**F**V**Q**L**L**T**D**L**R**V**A**I**S**G-----D**K**L**L**S**I**A**V**P**G**L**R**D-----M**M**A**F**T**E**E**T**V 180  
ChiMaC1 T**G**V-K**K**I**I**S**F**G**G**W**D**--F**S**A**L**P**E**T**Y**D--I**L**R**E**A**V**K**P**A**N**R-----N**K**F**K**--N**N**I**V**A**F**V**Q**H-----G**L**D**G**V**D**L**D**W**Y**P**G**A**P**D**I**P**D**I**P**-----A**D**D**F**O**N**G**L**Y**Y**K**L**L**S**L**V**K**S**D**L**G**S**-----S**K**S**V**S**F**A**A**P-----S**S**F**W**Y**L**K**A**F**V**P 751  
ChiMaC2 T**G**V-K**K**I**L**A**F**G**G**W**I**--F**S**T**D**P**A**T**Y**G--I**F**R**T**G**V**S**F**A**H**R-----L**Q**M**A**Q**S**I**A**K**F**I**D**N-----E**L**D**G**V**D**I**D**W**Y**P**A**A**E**D**L**P**D**I**P**-----A**G**D**E**A**E**G**I**N**Y**L**K**F**L**I**L**K**Q**L**L**P**T**-----D**K**T**L**S**F**A**A**P-----A**S**F**W**Y**L**K**G**F**P**I 676  
ChiMaD2 --V**K**V**L**L**M**L**G**G**A**A**P**G**T**Y**Q**R**L**D**S**E**P**-----D**Q**F**E**S**Y**A**P**L**R**Q**L**I**R**D**K**N**L**D**G**V**D**L**D**W**E**P**M**S**L**A**G**-----I**V**R**L**I**D**R**L**R**A**D**F**G**P**G-----F**V**I**T**L**A**P**V**A**M**A**L**L**D**-----P**E**K**N**L**S**G**F**D**V**E**A** 182  
ChiMaD3 A**G**V-K**V**M**G**M**I**G**G**A**P**G-----F**T**S**E**T**L**D**G**E**D**V**F**E**K**Y**Y**-----T**Q**I**R**E**V**I**F**Y**R**Y-----E**L**D**G**L**D**I**D**V**E**Q**P**M**S**Q**D**G-----I**V**R**L**I**D**K**I**H**C**D**F**G**S**G-----F**I**I**T**L**A**P**V**A**S**A**L**K**N**-----G**N**L**S**G**L**D**Y**K**L** 184  
ChiMaB5 N**G**V-K**V**I**I**S**L**G**G**R**G**-----A**V**S**L**S-----S**Q**D**E**A**E**A**I**G**Q**N**L**W**D**A**Y**N**T**K**N**T**G**R**V**P**R**P**F**G**K**T-----F**V**D**G**W**D**F**D**I**E**S**N**S**Q**N**E**-----Y**G**F**L**I**A**K**L**R**S**N**F**A**S**D**S**-----E**N**R**Y**F**I**T**G**A**P**-----O**C**F**V**-----P**E**P**N**M**G** 185  
ChiMaB6 N**G**V-K**V**L**L**S**L**G**G**A**S**G-----A**V**S**L**T-----S**Q**Q**E**A**E**T**I**G**Q**N**L**W**D**A**Y**G**A**G**S**N--A**A**V**P**R**P**F**G**N**I**-----F**V**D**G**W**D**F**D**I**E**S**N**A**G**N**G**-----F**Y**P**S**M**I**A**R**L**R**A**N**F**A**S**D**P-----G**R**A**V**L**I**T**G**A**P**-----O**C**P**I**-----P**E**P**N**M**N** 191  
ChiMaB1 A**G**V-K**V**I**L**S**L**G**G**A**T**S-----S**Y**S**L**Q-----H**Q**A**Q**A**E**Q**I**Q**Y**L**D**S**Y**G**N**S**G**N--K**T**V**Q**R**P**F**G**S**N**-----S**V**N**G**F**D**F**D**I**E**V**N**G**S**S**Q**-----Y**Y**Q**Y**M**I**A**K**L**R**A**N**F**A**S**D**K-----S**N**T**Y**L**I**T**G**A**P**-----O**C**P**I**-----P**E**P**N**M**G** 199  
ChiMaB3 F**K**K-T**I**V**L**S**L**G**G**A**T**-----Y**S**Q**G**G**W**S**S**T**Q**D**A**E**K**A**A**Q**S**V**W**D**M**F**G**P**V**P**S**G**K**V**D**R**P**F**G**S**A**-----V**V**D**G**F**D**F**D**E**S**T**T**N-----L**P**A**F**G**A**K**L**R**S**L**M**D**A**G-----G**K**K**F**Y**L**T**A**A**P**-----O**C**F**V**-----P**D**A**A**V**G** 193  
ChiMaB4 N**G**K-T**I**I**L**S**L**G**G**A**T**-----Y**G**Q**G**G**W**S**S**V**S**A**A**Q**E**A**A**Q**N**V**W**D**M**F**G**P**V**P**S**G**K**A**I**D**R**P**F**G**S**A-----V**V**D**G**F**D**F**D**E**F**A**S**T**N**-----L**P**A**F**G**Q**K**L**R**S**L**M**D**A**A--G-----G**K**K**F**Y**L**T**A**A**P**-----O**C**F**V**-----P**D**A**A**V**G** 208  
ChiMaC3 P**N**V-K**R**I**L**S**L**G**G**W-A-----Y**S**T**E**P**A**T**Y**N**I**R**D**A**I**I**N**N**R**Q-----V**F**A**S**--N**L**A**G**F**V**D**E**-----G**I**D**G**V**D**I**D**W**Y**P**G**A**P**D**I**Y**V**G**G**Q**P**-I**G**Q**K**S**D**G**V**N**Y**L**K**L**E**T**V**L**K**A**R**I**G**S-----E**K**S**V**S**I**A**A**D-----A**S**Y**W**Y**L**K**S**F**I** 704  
ChiMaB2 R**G**K-P**V**I**L**S**M**G**G**A**T**-----D**Y**S**D**V**Q**L**H**S**D**A**E**G**Q**I**A**N**T**V**V**N**L**F**L**G--G**T**D**H**K**L**R**P**F**G**D**V**-----K**L**D**G**V**D**L**D**N**E**I**N**-----D**G**T**G**Y**L**A**M**L**K**T**V**K**A**F**Q**K-----D**T**S**K**K**Y**I**T**A**A**D-----O**C**F**Y**-----P**D**Q**S**E**P**L**D**V**C**R- 198  
ChiMaB7 G--V**K**V**L**L**A**T**G**G**A**H**I**P**G**-----T**S**E**Y**A**V**S**S**E**E**K**G**V**E**F**A**E**F**L**Y**N**A**F**G**P**Y**K**S**W**T**G**R**P**P**F**D**S**T**A**H**V**S**V**D**G**F**D**L**L**E**D**R**T**P**K**F**K**N**G**P**-----Y**I**A**M**V**N**W**W**R-----Q**S**H**K**M**F**I**T**A**A**P**E**C**V**M**F**G-----N**Q**N 185  
ChiMaC4 Q**P**D**L**K**I**V**A**L**G**G**W**C**S**-----I**V**L**K**L**M**D**K**F**N**-----F**D**G**V**D**I**D**W**Y**P**V**A**P**D**R**D**G**R**G-----E**D**Y**E**N**I**V**T**F**M**K**L**R**E**R**M**D**K**S**R**R**G**-----V**S**M**A**L**P**-----A**S**Y**W**Y**L**Q**H**F**D**I 219  
ChiMaD1 A**A**G**A**T**I**V**M**S**I**G**G**A**T**-----A**A**I**D**L**S**S**S**S**V**A-----D**K**F**V**S-----T**I**V**P**I**L**Q**Y**N-----F**D**G**V**D**I**D**I**E**A**G**L**S**G**S**G**T**F**G-----T**L**S**T**S**Q**A**N**L**V**R**I**D**I**G**L**A**Q**M**P**S-----N**F**G**L**T**A**P**E**T**A**Y**T**G**G**S**V**Y**T**G**A**I**W**A**L**P**I**I 199  
..... 760..... 770..... 780..... 790..... 800..... 810..... 820..... 830..... 840..... 850..... 860..... 870..... 880..... 890..... 900

B

ChiMaA1 GDLGK--VLDYINLMAVDFSGSWSNSAANNANLYANPGNLNATPF-----NDDAVNDYIKGGVPASKIVLG-----MPIYKGSFQKTNIGC-----KPFSG- 288  
 ChiMaA6 AKLGA--ILDYVHLMAYDFAGSWSKTSGLLAHLYTNPQLVNRS--ADSAVRDVIKGGVPPHKLVLG-----MPVYGRAFNNTTGLG-----APFPT 284  
 ChiMaA4 AEMDK--YLDFAVLMAYDYAGSWSVSGHQANIY--PGNNASTPF--SINAAVDYITSHGVAANKIVLG-----MPLYGRAFNNTDGGP-----KPFQG- 276  
 ChiMaA2 SMAAD--YLDFAVLMAYDFGMMWTPKSGHHSQLYAMSREDFSGS-----SVAHLMHSGFPGGILLG-----IPTYGRSFQHATGPGQKFKG----- 270  
 ChiMaA8 SKFAE--VVDFAVLMQYDMNGAWGNETGNAPLNFEFGKATQRS--FATAIEEWTAGWPANKLISG-----LALYGRSVTTEVDMLAQDPVTOVANFSKQVPGKDDLDELEREICP-PNFAV 280  
 ChiMaA9 SGFAK--VVDFAVLMQYDLNGAWAETSGPLAPLNFEKKGQTQLSFA--T-----AIEAWTKAGWPAKQITAG-----AAFYGYSVTATEDMLKTNPPNQWAKMVKER-----PKGDQDEDMVTE 273  
 ChiMaA5 PKIDK--AVDFVNVMTYDLMNRRDNAIHHHTSVVD--CAHTIDTYIKRGMATASKMNLG-----FAFYAKYFTTKDGVCEA-----EPTGCP TAVLEAPP--GS 256  
 ChiMaA7 PKIDK--TVDFINVMYDLMNRRDNAIHHHTSVEG--LQVVDNVIQRMSPSKMNLG-----FAFYAKYFTTKDGVQCL-----EPTGCP TAVLESAD--GS 257  
 ChiMaA3 PRIVK--QVDFINVMYDILLNRRDRTLKHHSQVSA--SLESIESVIARGASAPVNLG-----LAYVVKWAMTEE--CDD-----DHPLSCTPTOLLEDPENGA 267  
 ChiMaC1 IIMAK--SLDYIVFMTYDLHGQWD---YGNKWTSPGCP TGNCLR--SHVNHTELDALAMITKAGAPSNKVVWG-----VASYGRSFKMAEAG--CDGFLCKFTGTARIENNAKGRCDTAG----- 859  
 ChiMaC2 AQIMK--VVDYVVMYDYLHGQWD---YGNKWTSPGCPAGNCLR--SHVNMTELNALSMTIKAGAPSNKIVAG-----VSYGRSFKMATPG--CTGPMCTYTGPK--QAAKGRCDTAG----- 782  
 ChiMaD2 LEVMRGKQIAWYNTQFYCGWG-----NLNTTLMYDLMLOKQWSPKELVVGVTNPANGSGCFVPWEMLSAILAILHRRHRNFGGVGMWGFNLSLPGDASRPWEWAGNMSSLLRAHSLGVPVTPAG 301  
 ChiMaD3 LEVRKGGCKISFYNCQFYGG-----FGTMS--TKDYHDIVTNGFKASRVVAGQLSSGTL--TYDR--LGQLNINTTIVSLREKYG----- 258  
 ChiMaA9 -QIISKAKFDYLWIQFYNN--PSCS-----VDG--TINFED-WKTFVAK--PSACAKLFIG--VPAHPLAANGVGTGAR--YYLEP--YKLAALVG--QYRDDP----- 269  
 ChiMaB6 -EIIITRAFDFYLWQFYNN--PSCS-----VDG--AINFAE-WKSNVAG--PSANAKIFIG--VPASPLGATGLASGAR--YYLEP--GKLAALVG--RYSSDA----- 275  
 ChiMaB1 -VIIISNSVFDHLYVQFYNNMNYTVP-CALG-----INGNAPFNINWTSFIAD--PSAGAKIFIG--VPASPLASTGTPSGAQ--YVAAP--EQLAAIVG--EYRSDA----- 291  
 ChiMaB3 -SALQAVAFDFIMIQFYNN--WCGVSNFPGSDTQDAFNFD--VWDKWAAG--SKNPNIKLLIG--TPANKGAGGGVTNGE-----KLKAVIANSKFTS----- 279  
 ChiMaB4 -AALNAVSPDFIMIQFYNN--WCGVSNFQEGSATQAFNFD--VWDNWAKTSPNKNIKLLIG--VPAPAGAGGGVTSGS-----KLKAAINWSQKYSN----- 295  
 ChiMaC3 DRIAS--IVDYIVVMYDYLHGQWDAG--NPNADFECPSGRCLIR--SHVNLTENNMMLVMIKAGVNNKIFVG-----EASVGRSFRMAKEG--CWGPTCRFTGSRTOETANPGRCNTRG----- 812  
 ChiMaB2 -LLDWVQVQFYNNGNCAIACSG-----FATAVKNWVRGIGSG-VQLYIGA--LASGADGDEGYVDA-----VLN--RAIDQVKAMDLN----- 272  
 ChiMaB7 DELLIANAEFFDALFIQFYNNPCDAIENNPFGDKFSYDEWATKVAITGKSKN-----AKLFIG--LPASTDSAG-----MSYIARTFTLTDPGCNKPGCRVSSPGEAGKCSGTAGVLLHPEIQEIIYKNN 250  
 ChiMaC4 VKLEEH--VDWFLMFDYDMHCAWDIDNKWTFGWANSHTNLTIEQLG-----LDLWRNDISPSKVTMG-----MSYIARTFTLTDPGCNKPGCRVSSPGEAGKCSGTAGVLLHPEIQEIIYKNN 331  
 ChiMaD1 KKADNQRLLWVLMQYVNGAMYGCS-----GDSYEAGTVKGFVAQTDCLDKGLVIOGTTIRVYD-----KQVPELPAQSGAG----- 272  
 .....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050



ChiMaA1 --VGDGSWENGINDYKVLPKAGATV-----LYDDVAKGYYSVNDNRQELISYDTPDIKKEKVTYLK--SKLGGSMFWEASAD-----RQGPD--SLIGTSSNKLGGP--DATENLLNVPDSKYDNMRKQMA----- 402  
 ChiMaA6 PPTADNDAPD--TYNKNLPEKAGAVE-----LEDDVAKAVYSVNDNRRELI SYDTPAVTRDKVAVYVK--RLGLGGSMFWEASAD-----RNGSQ--SLIGTSLHALGSL--DSSKNLLDVPDSRYANIRNKMA----- 399  
 ChiMaA4 --VGEETWENGVDYDKLPLEGSEE-----FSDNQASQASYCSAANRKLVSVDLAPMAKTKAEYVK--QRALGGAMWVESGD-----KSGSD--SLISTVVEITGGPGCLQKLDNCTIYPEIKYDNLRDGFNN----- 395  
 ChiMaA2 ---GGNDGTFEYNQLPRKCKE-----VDKRHISAQCVGGDG--GFVTDNEDTVKAKAFAK--QKGLGGLFYVNGTADSKETS-----SLVAAQFRALHTS----- 359  
 ChiMaA8 SVNGTEEAWSGANRYASLRQGVLTATPTSPFPVWR--TFDSITMTPLWLFNPEIKTYIYDDPEVSDAKVFKAL--SKGLAGTMAWEIAGD-----FNGELLAAVRGALV----- 382  
 ChiMaA9 PCSAPKTYTGINTYKNLRGGVLSPEDEAKAPVWR--TFDNKMTPLWLFNSEKVFISYDDQORSLAAKVKFAE--SKLGGMMVWSIERDYNCELL--GELKFKGSK----- 375  
 ChiMaA5 DLNLGSAFTF-----EINENY--SKAAFTKALONGK--EDSAGGMMWVWDSSTKQYVWTDAPDLIARKEKEI VAAKLLGGVMAWSLAQDSDHWSH--FKAMQAGVKSL----- 352  
 ChiMaA7 DYLSGAVTF-----EIDNYSNAAFANALKNGR--QDSARGGQWFWDGSTEIYVWTDAPDLIARKEKEI VSAKLLGGVMAWSLAQDSDHWSH--SKAVQAGVKEL----- 354  
 ChiMaA3 DLRTAAFSWHDKIPEELEQS-----FSRAMTNGKY--FEDGSFG--NLDVKEARWVDFENVIHHRKEKEIVKQRRLGGVFAWGI GEDAPAFSH--LSALHLELQNLKDDLGEAASKDEL----- 378  
 ChiMaC1 --YISNABIAEIIASGRVN-----KQWMEAG--SNIMVYDDTEWVAVMDDN--LKAVRSKVYDFNFAGTIDWAVDLQEF-----LEDNGSVDSDDAAGDDDMYIDADYFADCTGYFSILDGIE 966  
 ChiMaC2 --YISQNEIDYI IKN--NPSA-----TKLYDDAS--LSNLIYDETEWVAVMSAD--IKKRRLHYRALNLFASDWAISLD-----GTDLVKPEP-----SITMSFVG 867  
 ChiMaD2 TDIQPSVDGEVDPDPVNNRPLEVPEKSEFYVSDGTDHE-----RIGGIMGWEXYGLSVTRG-----MDEPWRWAQAMTQILRPKFLSSRATADQLGGGI----- 308  
 ChiMaD3 -----AFGGVMMSAGFSDANLNN--QCTYAQEAQRVLN-----GKIC----- 306  
 ChiMaB5 -----AFGGVMMSAGFSDANVRD--GRTYAQVSKAILANDTVPTGVDSAC----- 321  
 ChiMaB1 -----HFGGIMMSAGFSDANVND--GCTYAQQAASLILVN-----GAPCPSSGPPSSTPATAAPATAITMPSSTS----- 354  
 ChiMaB3 -----FGGVMWDMDSQ--LYANEG--FLGEVVSDLA----- 306  
 ChiMaB4 -----FGGVMWDMDSQ--L-----LYANSA-----FLGEIVSDISNGPTITLPPGGITITITITITATITITITTTT----- 352  
 ChiMaC3 -----YLAYAEIKELIRAGANV-----KKFHDGDSNTDVLVLYNG--DYVGYMTEPTTKDTRRTDWRK--INFAGLIDWAVDLQKFSDEE--KTN-----TDRPQSGGQCSISGDMTLETLEMCEFACEYGFCEP--SLCIC 929  
 ChiMaB2 -----FGGAMLWEAQL-----AVNNGNYQKLIKANL----- 298  
 ChiMaB7 -----SGYIVPKALKDLVCEYNSHKNFVGGVSLWDATRAMNVDAEGKSFLOSAAEAVQYVCGEPPKTTSSAPTSTKITST--SSTIVKTTTSA--SEKPT 342  
 ChiMaC4 LKFPVLN-----REVAVK--ISRCNQWTSFDDAATWRLKANKQR--GOCITGFMVAISDDEFGTIN--AQALASVIG-----RKKLELFPNFAIRAKVEDSDLESKTCRWTSCEYEGCP--SG 436  
 ChiMaD1 -----GGYMFPSLVG-----QAWDHYNGSLKGLMNTWSINWVDSKNWTFGDNVKGRL----- 318  
 .....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200



**Anexo 2. Região central do alinhamento entre as quitinases preditas de *M. anisopliae*.** O alinhamento gerado pelo programa Clustal (conforme seção 4.3.3) possibilitou o agrupamento das quitinases em diferentes subgrupos na árvore filogenética demonstrada no Anexo 1. A região demonstrada em A e B são parte do alinhamento total. Podem ser observadas no mínimo oito regiões conservadas entre todas as quitinases, incluindo os domínios SxGG e DxxDxDxE.

## Ângela Junges

Curriculum Vitae

---

### Dados Pessoais

**Nome** Ângela Junges  
**Filiação** Guido Junges e Alcía Maria Junges  
**Nascimento** 28/03/1981 - Porto Alegre/RS - Brasil  
**Carteira de Identidade** 1081767509 SJS - RS - 01/08/1997  
**CPF** 00077982029

**Endereço residencial** Rua Valparaíso, 728  
Jardim Botânico - Porto Alegre  
90690-300, RS - Brasil  
Telefone: 51 32090381

**Endereço profissional** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia  
Av Bento Gonçalves 9500 Campus Vale  
Agronomia - Porto Alegre  
91501-970, RS - Brasil  
Telefone: 51 33086079

### Endereço eletrônico

e-mail para contato : [ajunges@cbiot.ufrgs.br](mailto:ajunges@cbiot.ufrgs.br)  
e-mail alternativo : [angela\\_junges@yahoo.com.br](mailto:angela_junges@yahoo.com.br)

---

### Formação Acadêmica/Titulação

**2008 - 2010** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Centro de Biotecnologia - UFRGS, CBIOT - UFRGS, Brasil  
Título: *Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases  
Orientador: Augusto Schrank  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2003 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Expressão do peptídeo tóxico Jaburetox-2Ec da leguminosa *Canavalia ensiformis* no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*  
Orientador: Augusto Schrank  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

### Formação complementar

**2007 - 2007** Extensão universitária em Biologia Molecular Computacional.  
Centro de Biotecnologia - UFRGS, CBIOT - UFRGS, Brasil

**2006 - 2006** Extensão universitária em Clonagem e Expressão em Sistema Gateway.  
Centro de Biotecnologia - UFRGS, CBIOT-UFRGS, Brasil

**2006 - 2006** Curso de curta duração em Bioinformática.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

**2006 - 2006** Extensão universitária em Biologia Molecular de Fungos Patogênicos Humanos.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

- 2006 - 2006** Extensão universitária em Radicais Livres: Verdades, Falácias, Angústias e i.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Curso de Imunologia Básica.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Centro de Biotecnologia - UFRGS - CBIOT - UFRGS

#### Vínculo institucional

- 2008 - 2010** Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Estudante de Mestrado,  
Regime: Dedicção Exclusiva
- 2004 - 2007** Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação  
Científica, Regime: Dedicção Exclusiva

---

## Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Genética Molecular e de Microorganismos
3. Biologia Molecular de Fungos Filamentosos

---

## Idiomas

- Inglês** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
- Espanhol** Lê Pouco

---

## Produção em C, T& A

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. Boldo, Juliano Tomazzoni, Amaral, Karina Bohrer do, JUNGES, ANGELA, Pinto, Paulo Marcos, Staats, Charley Christian, Vainstein, Marilene Henning, Schrank, Augusto  
Evidence of alternative splicing of the chi2 chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. *Gene (Amsterdam)*. , v.462, p.1 - 7, 2010.
2. 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*. , v.55, p.551 - 560, 2009.
3. Staats, Charley Christian, JUNGES, ANGELA., Fitarelli, Mariana, Furlaneto, Marcia, Vainstein, Marilene Henning, Schrank, Augusto.  
Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*.. *Applied Microbiology and Biotechnology*. , v.Jul, p.945 - 950, 2007.

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

1. JUNGES, A., MARTINELLI, A. H., BROETTO, L., BOLDO, J. T., VAINSTEIN, M. H., CARLINI, C. R., SCHRANK, A.  
Expressão do peptídeo tóxico Jaburetox da leguminosa *Canavalia ensiformis* no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas -PE.

**Livro de Resumos do 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia.** , 2009. v.1. p.1 – 2

2. BOLDO, J. T., JUNGES, A., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

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

3. JUNGES, A., BOLDO, J. T., SCHRANK, I.S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H.

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.

4. STAATS, C. C., FITARELLI, M., JUNGES, A., FURLANETO, M., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

*Agrobacterium tumefaciens* mediated gene targeting applied to *Metarhizium anisopliae* In: 51 Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia - SP.

**CD-ROM 51 Congresso Brasileiro de Genética.** , 2005.

5. PALMA, L.P., STAATS, C. C., JUNGES, A., BOLDO, J. T., BROETTO, L., SOUZA, T.S.F., SILVEIRA, C.P., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

Análise do Padrão de Expressão dos Genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em condições vegetativas e de infecção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP.

**Livro de Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia.** , 2005. v.1.

6. BOLDO, J. T., JUNGES, A., BROETTO, L., NAKAZATO, L., BARATTO, C.M., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

Construção de uma linhagem de *metarhizium anisopliae* superexpressando a quitinase codificada pelo gene *chi2* In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP.

**Livro de Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia.** , 2005. v.1.

7. JUNGES, A., STAATS, C. C., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H.

Desenvolvimento de um sistema de inativação gênica em *Metarhizium anisopliae* In: XVII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2005, Porto Alegre.

**CD do XVII Salão de Iniciação Científica - UFRGS.** , 2005.

8. STAATS, C. C., JUNGES, A., FITARELLI, M., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

Inativação Gênica em *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.** , 2004.