

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

**TRANSFORMAÇÃO DO ENTOMOPATÓGENO  
*METHARHIZIUM ANISOPLIAE* PARA SUPEREXPRESSION  
DA PROTEASE PR1A**

Trabalho de Conclusão

Ana Paula Miranda Guimarães

Porto Alegre, 2003

IFRGS - BIBLIOTECA  
INST. BIOCIÊNCIAS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

**TRANSFORMAÇÃO DO ENTOMOPATÓGENO  
*METARHIZIUM ANISOPLIAE* PARA SUPEREXPRESSION DA  
PROTEASE PR1A**

Ana Paula Miranda Guimarães

Trabalho de Conclusão apresentado  
ao Curso de Ciências Biológicas  
como requisito para obtenção do  
título de Bacharel em Ciências  
Biológicas, Ênfase Molecular,  
Celular e Funcional.

Orientação: Dr. Augusto Schrank  
Co-orientação: Dra. Marilene H. Vainstein

Porto Alegre, 2003

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. o projeto foi financiado por recursos do CNPq, PADCTIII, FAPERGS e uma bolsa CNPq.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Augusto e à Dra. Marilene pela orientação, ensinamentos e paciência durante o tempo do estágio de Iniciação Científica.

Aos colegas dos Laboratórios 107, 205 e 119, em especial à Melissa, que além da orientação, amizade e companheirismo, me ensinou com paciência e dedicação.

Aos meus amigos e familiares, que me apoiaram e me compreenderam em todos os momentos, em especial ao Victor pela amizade, ajuda e paciência.

Às instituições financiadoras CNPq e FAPERGS, que tornaram possível a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Centro de Biotecnologia pela oportunidade de realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b><u>INTRODUÇÃO</u></b>  | <b>7</b>  |
| 1.1      | <u>CONTROLE BIOLÓGICO</u>   | 7         |
| 1.2      | <u>O ENTOMOPATÓGENO E ACARICIDA METARHIZIUM ANISOPLIAE</u>                                  | 8         |
| 1.3      | <u>AS PROTEASES</u>   | 12        |
| 1.4      | <u>O CARRAPATO BOOPHILUS MICROPLUS</u>  | 17        |
| 1.5      | <u>OBJETIVOS</u>  | 21        |
| <b>2</b> | <b><u>MATERIAL E MÉTODOS</u></b>  | <b>22</b> |
| 2.1      | <u>ORGANISMOS E PLASMÍDEOS</u>  | 22        |
| 2.1.1    | <u><i>Linhagem de Metarhizium anisopliae</i></u>  | 22        |
| 2.1.2    | <u>Plasmídeos</u>   | 22        |
| 2.2      | <u>MEIOS DE CULTURA</u>   | 22        |
| 2.2.1    | <u><i>Meio de Cove (MC)</i></u>   | 22        |
| 2.2.2    | <u><i>Meio de Cove completo (MCc)</i></u>   | 24        |
| 2.2.3    | <u><i>Meio Luria-Bertani (LB)</i></u>   | 24        |
| 2.2.4    | <u><i>Meio com leite</i></u>  | 24        |
| 2.2.5    | <u><i>Meio com Glicose</i></u>  | 24        |
| 2.2.6    | <u><i>Meio com Cutícula</i></u>   | 25        |
| 2.3      | <u>REAGENTES</u>  | 25        |
| 2.3.1    | <u><i>Antibiótico</i></u>   | 25        |
| 2.3.2    | <u><i>Enzimas</i></u>   | 25        |
| 2.3.3    | <u><i>Soluções e Tampões</i></u>  | 25        |
| 2.3.3.1  | <u><i>Solventes orgânicos</i></u>   | 25        |
| 2.3.3.2  | <u><i>Tampão de amostra para ácidos nucleicos</i></u>                                       | 26        |
| 2.3.3.3  | <u><i>Tampão de extração (TEX)</i></u>  | 26        |
| 2.3.3.4  | <u><i>Tampão TE (Tris – EDTA)</i></u>   | 26        |
| 2.3.3.5  | <u><i>Tampão Tris-Borato (TBE) 5X</i></u>   | 26        |
| 2.3.3.6  | <u><i>Tampão acetato</i></u>  | 26        |
| 2.3.3.7  | <u><i>Soluções para PCR</i></u>   | 27        |
| 2.3.3.8  | <u><i>Soluções para géis</i></u>  | 27        |
| 2.3.4    | <u><i>Eletroforese</i></u>  | 27        |
| 2.3.4.1  | <u><i>Géis de agarose</i></u>   | 27        |
| 2.3.4.2  | <u><i>Géis de poliacrilamida</i></u>  | 28        |
| 2.3.5    | <u><i>Soluções para medidas de atividade enzimática de Protease do tipo subtilisina</i></u> | 30        |
| 2.3.5.1  | <u><i>Substrato utilizado</i></u>   | 30        |
| 2.3.5.2  | <u><i>Tampão da reação</i></u>  | 30        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>2.4</b> | <b><u>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</u></b> .....  | <b>30</b> |
| 2.4.1      | <i>Cultivo e manutenção dos organismos</i> .....   | 30        |
| 2.4.1.1    | <i>Metarhizium anisopliae</i> .....  | 30        |
| 2.4.2      | <i>Isolamento de DNA</i> .....   | 31        |
| 2.4.2.1    | <i>Extração de DNA de fungo</i> .....  | 31        |
| 2.4.3      | <i>Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose</i> .....   | 31        |
| 2.4.4      | <i>Amplificação de DNA de Metarhizium anisopliae</i> .....   | 32        |
| 2.4.5      | <i>Purificação dos produtos de PCR</i> .....   | 32        |
| 2.4.6      | <i>Digestão de DNA com enzimas de restrição</i> .....  | 32        |
| 2.4.7      | <i>Transformação mediada por DNA</i> .....   | 33        |
| 2.4.7.1    | <i>Transformação de Metarhizium anisopliae</i> .....   | 33        |
| 2.4.7.2    | <i>Análise dos transformantes</i> .....  | 33        |
| <b>3</b>   | <b><u>RESULTADOS</u></b> .....   | <b>36</b> |
| 3.1        | <u>CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS DE METARHIZIUM ANISOPLIAE</u><br><u>SUPEREXPRESSANDO A PROTEASE PR1A</u> ..... | 36        |
| 3.2        | <u>TRANSFORMAÇÃO DO FUNGO METARHIZIUM ANISOPLIAE</u> .....   | 36        |
| 3.2.1      | <i>Análise das linhagens co-transformadas de M. anisopliae</i> .....                                       | 38        |
| <b>4</b>   | <b><u>DISCUSSÃO</u></b> .....  | <b>45</b> |
| <b>5</b>   | <b><u>CONCLUSÕES</u></b> .....   | <b>49</b> |
| <b>6</b>   | <b><u>REFERÊNCIAS</u></b> .....  | <b>50</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

Neste estudo, propomos a construção de uma linhagem do fungo *Metarhizium anisopliae*, superexpressando a protease PR1A, para então diminuir o tempo de infecção no carrapato *Boophilus microplus* Assim, aumentando a eficiência do fungo *Metarhizium anisopliae* como biocontrolador.

## 1.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Os defensivos agrícolas propiciam uma alta produtividade ao setor agropecuário, que observa-se uma alta demanda e necessita-se de produtos qualificados para serem destinados ao mercado. Contudo, estes produtos químicos apresentam efeitos negativos, pois necessitam aplicações repetidas até a redução da população a níveis aceitáveis, representando grandes quantidades lançadas no ambiente e um alto custo. A utilização intensiva de produtos químicos resulta em sérios problemas de desenvolvimento de resistência de pragas a diferentes grupos de inseticidas (LOPES *et al.*, 2000). Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada destes compostos na cadeia alimentar.

O controle biológico considera que toda a espécie possui inimigos naturais, que inibem o seu desenvolvimento, havendo a possibilidade de serem utilizados como controle de populações de pragas. Um biocontrolador eficiente deve causar a morte ou redução do crescimento populacional da praga (MELO E AZEVEDO, 1998). Assim, o controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas e patógenos e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência.

O controle biológico é uma das alternativas viáveis também para o combate de carrapatos. Os métodos mais recentes de controle biológico de carrapatos incluem a seleção de raças de animais menos sensíveis ao carrapato; o cultivo de pastagens que dificultem a sobrevivência das fases de vida livre do carrapato (SUTHERST *et al.*, 1982; FARIAS *et al.*, 1986); a presença de predadores do carrapato no ambiente como a garça branca vaqueira *Egretta ibis* (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983); o uso de patógenos como as bactérias *Rickettsia prowazeki* (BURTON & BURTON, 1969), *Proteus mirabilis* (BROWN *et al.*, 1970) e *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988), ou os fungos filamentosos como *Beauveria bassiana*

(GORSHOKOVA, 1966 e CORDOVÉS, 1996) e *Metarhizium anisopliae* (ZHIOUA *et al.*, 1997; CORREIA *et al.*, 1998 e FRAZZON *et al.*, 2000).

Entre os microrganismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico se destacam os fungos filamentosos. Os fungos filamentosos estão sendo empregados como biocontroladores no estudo de carrapatos de diferentes gêneros e espécies, como, por exemplo, *Boophilus microplus* (CORREIA *et al.*, 1998 e FRAZZON *et al.*, 2000), *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997), *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* (KAAYA *et al.*, 1996). Quando comparados aos outros sistemas utilizados em controle biológico como as bactérias produtoras de toxinas, os protozoários e os vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo, assim, da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção.

O maior entrave para a utilização dos microrganismos no controle biológico é o maior tempo necessário entre a aplicação e a morte dos hospedeiros, em comparação aos pesticidas químicos. Durante este período de tempo, as pragas podem causar sérias perdas. Um dos objetivos comuns no estudo destes microrganismos em controle biológico visa aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros para melhorar a eficiência do biocontrolador. Esforços têm sido realizados no sentido de melhorar a produção, a estabilidade e a aplicação de inóculos dos fungos. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o hospedeiro tem permitido o conhecimento da natureza da patogenicidade, possibilitando a introdução de genes específicos, altamente expressos em condições de infectividade, visando acelerar o processo de infecção, diminuindo, assim, o tempo entre o início da infecção e a morte do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1996a).

O controle biológico tem sido mais empregado em países considerados menos desenvolvidos. Uma razão provável é o alto custo e a dependência de tecnologias mais avançadas para a produção de pesticidas químicos nestes países. Entretanto, as pesquisas básicas com os microrganismos de interesse para este tipo alternativo de prática têm sido, principalmente, desenvolvidas nos países do primeiro mundo.

## **1.2 O ENTOMOPATÓGENO E ACARICIDA *Metarhizium anisopliae***

O fungo *Metarhizium anisopliae* é pertencente à classe Hiphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliacea. Foi descrito pela primeira vez por METSCHNIKOFF, na

Rússia, em 1879, parasitando larvas do besouro-do-grão-de-trigo (*Anisopliae austriaca*; ALVES, 1998). TULLOCH (1976) revisou a taxonomia do gênero *Metarhizium* e manteve duas espécies: *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae*; a última apresentando duas variedades, a *anisopliae minus* e a *majus*. DRIVER *et al.* (2000) reconheceram três espécies para *Metarhizium*: *Metarhizium anisopliae*, variedades *anisopliae*, *majus*, *lepidiotum* e *acridum*; *Metarhizium flavoviride*, variedades *flavoviride*, *minus*, *novazealandicum* e *pemphigum*; e *Metarhizium album*.

A espécie *M. anisopliae* apresenta micélio hialino e septado. Os conídios são geralmente uninucleados e cilíndricos. São conhecidas duas formas de reprodução: a reprodução assexuada, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexual, que envolve os fenômenos de heterocariose e de recombinação mitótica.

*M. anisopliae* infecta mais de 300 espécies de insetos. Alguns de seus hospedeiros são pragas na agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha-das-pastagens (*Deois sp* e *Zulia sp*), a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), a formiga saúva (*Atta sexdens*), os térmitas subterrâneos (*Isoptera Rhinotermitidae*), entre outros. Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas (SILVA & MESSIAS, 1986; SHERLOCK & GUITTON, 1992) e para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA *et al.*, 1996; ZHIOUA *et al.*, 1997; CORREIA *et al.*, 1998; FRAZZON *et al.*, 2000). Vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes de patogenicidade, entre os quais, a produção de toxinas e a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e lipases (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Alguns autores sugerem ainda que a expressão diferenciada das superóxido-dismutases (SODs), enzimas que atuam como um sistema de defesa contra radicais livres de oxigênio (SCHRANK *et al.*, 1993; BITTENCOURT, 1998), e a presença de micovírus com genoma de dsRNA (BOGO *et al.*, 1996b) influenciam a patogenicidade de *M. anisopliae*. São necessárias, entretanto, confirmações experimentais para estas observações.

Por ser considerado um dos agentes mais promissores no controle de pragas, *M. anisopliae* tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento e à seleção de linhagens do ambiente, ao isolamento de mutantes com características importantes para o controle biológico, ao estudo dos mecanismos de infecção, ao desenvolvimento de metodologias de biologia molecular e a estudos alternativos para a produção, a manutenção da viabilidade e a formulação de biopesticidas. O grupo de pesquisa dos Laboratórios de

Biologia Molecular de Fungos Filamentosos e Fungos de importância médica e biotecnológica do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS) estudam alguns aspectos básicos da biologia molecular de *M. anisopliae*, em especial o desenvolvimento de sistemas de transformação para permitir a re-introdução de genes manipulados *in vitro* (BOGO *et al.*, 1996a), o estudo da regulação de quitinases (BARRETO, 1996; PINTO *et al.*, 1996) e a clonagem e a caracterização do gene *chit1* que codifica uma destas quitinases (BOGO *et al.*, 1998). O grupo dedica-se, ainda, ao estudo da aplicação de *M. anisopliae* como biocontrolador do carrapato *B. microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000).

*M. anisopliae* infecta seus hospedeiros em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (SCHRANK *et al.*, 1993; ALVES, 1998). O processo é iniciado pela germinação dos esporos sobre a cutícula do inseto, mas este processo pode ser inibido por altas temperaturas, que impedem o desenvolvimento do fungo e até mesmo, pode causar a sua morte (IBRAHIM *et al.*, 1999). Na superfície do esporo, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas (proteases, esterases e N-acetilglicosidases) que têm efeito na adesão, na aquisição preliminar de nutrientes e que também causam modificações superficiais nas camadas mais externas da cutícula do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1990). O esporo germina e o tubo germinativo se diferencia por dilatação da extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, que também estabelece a relação nutricional com o hospedeiro, estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1991b, 1989). Esse estímulo também é sensível a alterações da superfície, indicando um possível mecanismo pelo qual o patógeno reconhece seu hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1990).

Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que são caracterizadas por uma alteração na parede celular da parte do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (ST. LEGER *et al.*, 1991b). Evidências obtidas por microscopia eletrônica e histoquímica sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica (ST. LEGER *et al.*, 1988a). Depressões rasas observadas, algumas vezes, no ponto de penetração, indicando a pressão física e zonas de lesão tecidual, indicando digestão enzimática da cutícula, também evidenciam esta combinação (BIDOCHKA *et al.*, 1997). Nesse processo são produzidas algumas enzimas como proteases, quitinases e lipases (KUCERA, 1980; ST. LEGER *et al.*, 1986a, b, 1988b, 1991a; PINTO *et al.*, 1996; ALVES,

1998). As proteases são detectadas antes das enzimas quitinolíticas, em um período inferior a 24 horas após o início da formação do tubo germinativo. Após o processo de penetração, o fungo inicia a etapa de colonização do hospedeiro. As hifas que atravessaram a cutícula do hospedeiro sofrem um engrossamento e se ramificam inicialmente no tegumento e posteriormente na cavidade geral do corpo, liberando toxinas e ocasionando a morte do hospedeiro devido à produção de metabólitos secundários denominados destruxinas, que afetam os canais de transporte de íons, envolvidos na resposta muscular e na integridade da membrana celular. O hospedeiro exhibe vários sintomas incluindo inquietação, perda de coordenação e parada da ingestão de alimento (LAVERLAM, 1999). A destruxina é uma toxina ciclodepsipeptídica com várias atividades inseticidas, cuja produção foi detectada em certas linhagens de *Metarhizium*, podendo ser importante na determinação da virulência e/ou especificidade do fungo pelo hospedeiro. Foram detectadas quantidades diferentes de destruxinas A, B e E em diferentes linhagens de *Metarhizium*, sendo a destruxina A predominante. Linhagens muito virulentas produzem grandes quantidades de destruxinas, mas linhagens que produzem pouca toxina são também virulentas, sugerindo que as destruxinas não são os únicos determinantes da patogenicidade (AMIRI, 2000). Estudos da toxicidade e da patogenicidade das destruxinas de *M. anisopliae* não mostraram efeito tóxico em testes com mamíferos. Estes dados sustentam a idéia da especificidade da toxina ao hospedeiro, pois a linhagem testada era altamente virulenta para a barata alemã (*Blattella germanica*) e para a mosca doméstica (*Musca domestica*; EPA, 2001).

Após a morte do hospedeiro, que ocorre de quatro a cinco dias após a infecção, as hifas se desenvolvem invadindo os diversos órgãos internos. Após o esgotamento dos nutrientes, as hifas se estendem para fora do corpo do hospedeiro, formando um micélio que recobre a superfície do tegumento, resultando na mumificação. O tempo de colonização pode variar de 76 a 120 horas, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais. Em condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos de coloração verde oliva que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos (LAVERLAM, 1999; Figuras 1.1 e 1.2). A grande variabilidade genética que apresenta esta espécie de fungo resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz UV (ALVES, 1998). A entomopatogenicidade de *M. anisopliae* é dependente de um relacionamento complexo entre a capacidade do fungo para

germinar e penetrar na cutícula e a capacidade do hospedeiro em evitar o desenvolvimento do fungo.

Linhagens patogênicas de *Metarhizium* para uma espécie particular de hospedeiro podem não apresentar as mesmas características de patogenicidade para outras espécies (HUXHAM *et al.*, 1989).

A cutícula do hospedeiro representa a principal barreira para a infecção do fungo. O tegumento dos insetos é composto por três camadas principais: a cutícula externa, a camada celular ou epiderme e a membrana basal. A cutícula é constituída por duas camadas relativamente distintas: a epicutícula e a procutícula. Juntas, elas são consideradas a principal proteção do inseto ao ataque de microrganismos. A epicutícula é uma camada externa e fina que apresenta uma estrutura complexa composta de proteínas, lipídeos, ácidos graxos e esteróides. A procutícula constitui a maior parte da cutícula e contém fibras de quitina embebidas em uma matriz protéica associada a lipídeos e quinonas (ANDERSEN, 1974). Esta natureza complexa da cutícula dos insetos sugere que a penetração do fungo pode necessitar da ação conjunta de muitas enzimas diferentes (CLARKSON & CHARNLEY, 1996).

Alguns genes provavelmente envolvidos no processo de infecção de *M. anisopliae* já foram clonados e caracterizados: gene *pr1A*, codifica uma protease do tipo subtilisina (ST. LEGER *et al.*, 1992<sup>a</sup>), gene *ssgA*, codifica uma proteína hidrofóbica, (ST. LEGER *et al.*, 1992<sup>b</sup>), gene *pr2*, codifica uma protease do tipo tripsina (SMITHSON *et al.*, 1995), gene *pr1B*, codifica uma protease do tipo subtilisina (JOSHI *et al.*, 1997), gene *crr1*, codifica uma proteína reguladora de carbono (SCREEN *et al.*, 1997), gene *chit1*, codifica uma endo/exoquitinase (BOGO *et al.*, 1998), gene *chi11*, codifica uma endoquitinase (KANG *et al.*, 1998), gene *nrr1*, codifica uma proteína reguladora de nitrogênio (SCREEN *et al.*, 1998), gene *MeCPA*, codifica uma endoprotease (JOSHI & ST. LEGER, 1999), gene *chy1*, codifica uma protease do tipo chimotripsina (SCREEN & ST. LEGER, 2000). Entretanto, apenas no caso da protease PR1A, a função do gene foi demonstrada *in vivo*.

### **1.3 As proteases**

Foi observado que as proteases são as primeiras hidrolases a serem secretadas, no processo de penetração do fungo ao hospedeiro. Além disso, foi demonstrado que entre os genes expressados especificamente durante o processo de infecção de *M. anisopliae* no hospedeiro está o gene *pr1A* (originalmente descrito com gene *pr1*) que codifica uma protease



**GERMINAÇÃO**



**DIFERENCIAÇÃO  
APRESSÓRIO**



**PENETRAÇÃO**

**PROTEASES**, PR1A, PR1B,  
PR1...k, PR2  
**QUITINASES**, CHI30, CHI42,  
CHI52

**LIPASES ?  
TOXINAS**



**COLONIZAÇÃO**

**ESPOROS:  
INFECCÃO DE  
NOVOS  
HOSPEDEIROS**

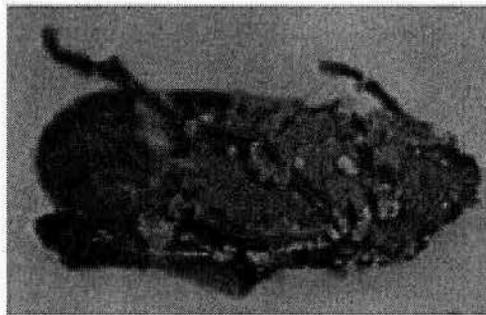
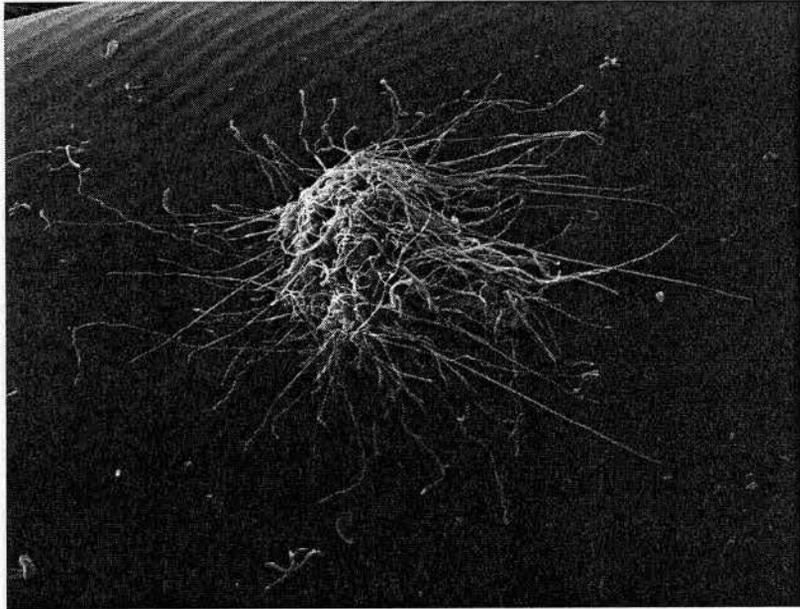
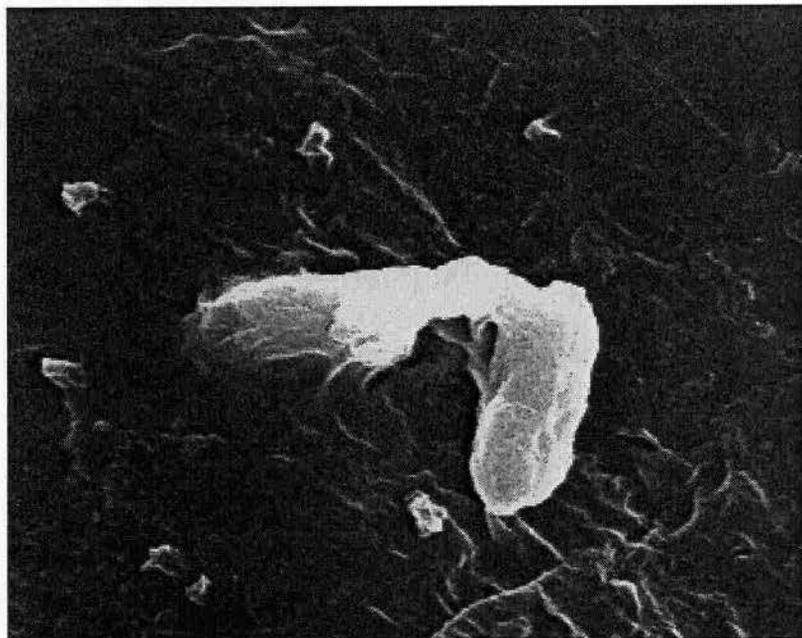


Figura 1.1 Ciclo de vida do fungo entomopatogênico e acaricida *M. anisopliae* (cedido por Schrank, A.).



**Figura 1.2** Infecção do fungo *M. anisopliae* na cutícula do carrapato *Boophilus microplus*. Eletromicrografia de varredura do desenvolvimento do fungo *M. anisopliae* sobre a cutícula do carrapato *Boophilus microplus* (cedido por Walquiria Arruda).



**Figura 1.3** Infecção do fungo *M. anisopliae* na cutícula do carrapato *Boophilus microplus*. Eletromicrografia de varredura do desenvolvimento do fungo *M.*

*anisopliae* sobre a cutícula do carrapato *Boophilus microplus*, mostrando o detalhe da estrutura de penetração do fungo, o Apressório (cedido por Walquiria Arruda).

do tipo subtilisina (PR1A), que tem uma participação marcante na penetração da cutícula do hospedeiro pelo fungo.

A importância de PR1A no processo de infecção foi sugerida pela sua capacidade de degradar cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1987a) e por seu acúmulo no sítio de penetração antes e durante a fase de hidrólise das proteínas da cutícula, demonstrando que é uma das determinantes de patogenicidade (ST. LEGER *et al.*, 1989). O pré-requisito para a hidrólise protéica da cutícula é a ligação eletrostática das proteases na cutícula, mostrando que a protease do tipo subtilisina de *M. anisopliae* (PR1) liga se eletrostaticamente com a cutícula do hospedeiro. Foi demonstrado que inibidores específicos da PR1A interferem na penetração do fungo na cutícula da lagarta do tabaco (*Manduca sexta*), indicando que a regulação do gene *pr1A* é importante na patogenicidade do fungo (ST. LEGER *et al.*, 1988b). CHENGSHU WANG *et al.*, (2002), analisando esporos de *M. anisopliae*, observou isolados mutantes para os genes *pr1A* e *pr1B*, e estes mutantes foram menos virulentos para determinados hospedeiros, em relação à linhagem selvagem.

A seqüência de cDNA revelou que PR1A é sintetizada como um precursor de massa molecular de aproximadamente 40 kDa, contendo um peptídeo sinal, um propeptídeo e uma proteína madura com massa molecular de 29 kDa. A estrutura primária de PR1A é similar a das serino-proteases da subclasse das subtilisinas, sendo que os aminoácidos componentes do sítio ativo (Ser, His e Asn) estão presentes.

A seqüência PR1A, quando comparada com a subtilisina Proteinase K, apresenta 61% de similaridade e se mostra duas vezes mais efetiva na degradação da cutícula de *M. sexta* e 33 vezes mais efetiva na degradação estrutural das proteínas ligadas à cutícula por ligação covalente (ST. LEGER *et al.*, 1992a). Este último dado se deve aos resíduos de carga positiva que se formam na superfície da molécula de PR1A quando em pH neutro ou alcalino, envolvendo os aminoácidos His17, Arg18, Lys20 e Arg26. Esses resíduos positivos facilitam a ligação eletrostática às proteínas da cutícula, pré-requisito básico para a atividade enzimática da protease. É característica da PR1A apresentar elevado ponto isoelétrico (pI > 10) (ST. LEGER *et al.*, 1992a).

O gene *pr1A* é altamente regulado e somente expressado durante a fase de penetração (ST. LEGER *et al.*, 1992a). Este gene está sob controle duplo de expressão: pelo mecanismo

de repressão catabólica regulado pelos níveis de carbono e nitrogênio (ST. LEGER *et al.*, 1988b) e pela indução específica promovida pelas proteínas da cutícula (PATERSON *et al.*, 1994). A protease PR1A hidrolisa de 25 a 30% das proteínas da cutícula dos hospedeiros liberando peptídeos que servirão de nutrientes para o fungo e substrato para a síntese de outros determinantes da patogenicidade (ST. LEGER *et al.*, 1986a).

PR1A é a única protease de cutícula produzida em quantidade elevada por vários isolados patogênicos de *M. anisopliae*. Foi observado, por ST. LEGER *et al.* (1987b), um aumento da secreção da protease PR1A durante a penetração do fungo *M. anisopliae* na cutícula de larvas de *M. sexta*.

O gene *pr1A* foi clonado no vetor de expressão pMAPR-1, sob o controle do promotor do gene constitutivo *gpd* (codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e do terminador do gene *trpC* (codifica indolil-glicerol sintetase) do fungo *Aspergillus nidulans*. O vetor foi co-transformado com outro plasmídeo que contém o gene de resistência a benomil, método utilizado para a seleção dos transformantes. Cópias adicionais do gene codificando a protease PR1A de *M. anisopliae* foram desta forma inseridas no fungo *M. anisopliae* de modo a sintetizar constitutivamente a protease na hemolinfa de *M. sexta*. Os transformantes mostraram-se 25% mais eficientes na infecção de insetos (ST. LEGER *et al.*, 1996a). Neste trabalho, foi definitivamente demonstrado o potencial da manipulação genética para ser efetivamente utilizado na construção de linhagens mais eficientes para o controle biológico a partir do conhecimento dos fenômenos básicos da etapa de penetração.

JOSHI *et al.*, (1997) investigando genes envolvidos no processo de infecção de fungos entomopatogênicos, descreveram uma nova protease também do tipo subtilisina (PR1B) a partir de genes especificamente expressados por *M. anisopliae* durante seu desenvolvimento na cutícula de baratas (*Blaberus giganteus*). A dedução da seqüência de aminoácidos mostrou 54% de similaridade com a subtilisina PR1A. A análise cariotípica revelou que os genes *pr1A* e *pr1B* estão localizados em cromossomos separados.

Num estudo de polimorfismo genético de três isoformas das proteases do tipo subtilisina (PR1A, PR1B e PR1C) de *M. anisopliae*, BIDOCHKA & MELZER (2000) mostraram que estes genes encontram-se num mesmo grupo relacionado geneticamente. Atualmente encontram-se disponíveis no *GenBank* seqüências de mais oito genes de proteases da família das subtilisinas PR1 denominados de *pr1D* até *pr1K*, que foram isolados de *M. anisopliae* pelo grupo liderado por St. Leger. Suas funções ainda não foram descritas.

Uma segunda classe de endoproteases a serino-protease PR2, detectada no cultivo de *M. anisopliae* em cutícula de insetos *in vitro* relacionada com tripsinas. Estudos demonstraram que a atividade de PR2 está presente na forma de isoenzimas, duas com maior massa (pI 4,4 e 4,9) e uma de massa menor (pI 5,2; ST. LEGER *et al.*, 1994). Duas destas isoformas de serino-proteases se mostram associadas ao apressório, sugerindo que estas enzimas estão disponíveis durante os primeiros estágios da colonização da cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1996b). Embora o gene que codifica uma destas serino-proteases tenha sido clonado e caracterizado (*try1*), ainda não está completamente elucidada a função de PR2 na patogenicidade (SMITHSON *et al.*, 1995). Entretanto, tem sido sugerido que a protease PR2 pode ser relevante na indução ou na ativação de PR1A (SMITHSON *et al.*, 1995). A proteína PR2, também é regulada pelo mecanismo de repressão catabólica pelos níveis de carbono e de nitrogênio (ST. LEGER *et al.*, 1988). O gene *pr1A* do fungo *M. anisopliae* é regulado pela resposta aos níveis de carbono e nitrogênio.

O pH do meio parece ser o maior determinante da expressão das enzimas que degradam a cutícula do hospedeiro. Cutículas de insetos infectadas por *M. anisopliae* demonstraram um aumento no pH quando comparadas à cutícula não infectada (ST. LEGER *et al.*, 1998). ST. LEGER *et al.*, (1999) mostraram a influência que o fungo tem no pH do meio e como a mudança no pH influencia a produção das proteases que degradam a cutícula de insetos. O pH na margem das colônias em meio sólido é mais alto do que o pH no centro da colônia, o que reflete a grande atividade metabólica no ponto de expansão das hifas, incluindo reações que geram acúmulo de amônia. A produção de amônia eleva o pH do meio e induz a produção de proteases do tipo subtilisina, cujas atividades são observadas somente em pH alcalino. Os autores concluem que a amônia pode ser um fator de virulência não considerado previamente, com potencial de causar dano a tecidos e distúrbios ao sistema imune dos hospedeiros.

#### **1.4 O carrapato *Boophilus microplus***

O carrapato *B. microplus* é um ectoparasita de bovinos, que causa perdas econômicas nos rebanhos de áreas tropicais e subtropicais (FRAZZON *et al.*, 2000). Este carrapato é geograficamente distribuído entre os paralelos 32° N e 35° S, envolvendo a América do Sul e a Central, a África, e a Austrália (MONTEIRO *et al.*, 1998).

No Brasil, a fonte protéica mais consumida na alimentação humana é a carne bovina (FAO, 1996) e a criação de gado emprega mais pessoas e área física do que todas as outras atividades de produção de proteínas de origem animal somadas. Existem aproximadamente 152 milhões de cabeças de gado no Brasil, das quais 13,5 milhões se encontram no estado do Rio Grande do Sul, ocupando cerca de 52% da superfície do Estado (BECHARA *et al.*, 2000).

Uma única fêmea de carrapato suga em torno de dois a três mililitros de sangue bovino (GONZALES, 1995). O efeito produzido pelos carrapatos durante o processo alimentar, ao utilizar o sangue e outros líquidos corporais, resulta em perdas difíceis de serem quantificadas, especialmente quando ocorrem grandes infestações (CORDOVÉS, 1996). Estas perdas causadas por *B. microplus* foram estimadas em quase 1 bilhão de dólares/ano no Brasil (HORN, 1987; COBON, 1997), quando contabilizadas a queda na produção de leite e carne, a mortalidade, a redução da natalidade, os gastos no seu controle e a transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da riquetsia *Anaplasma marginale* que causam a tristeza parasitária bovina (YOUNG & MORZARIA, 1986). Acompanhando os problemas de resistência a acaricidas (SOLOMON, 1983; NOLAN *et al.*, 1989; GONZALES, 1995) e a presença de resíduos químicos na carne e no leite, são necessários métodos alternativos de controle dessa praga (KUNZ & KEMP, 1994). Com isso, o desenvolvimento de métodos alternativos, como o controle biológico de carrapatos, pode ser uma alternativa viável.

O ciclo de vida do *B. microplus* compreende uma fase de vida livre e uma fase parasitária. A larva infestante, ao entrar em contato com o bovino, fixa-se em regiões do corpo do hospedeiro tais como úbere, mamas, regiões perineal, perianal, perivulvar e entrepernas que favorecem seu desenvolvimento. Estas regiões são determinadas pela espessura, pela vascularização e pela temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso do hospedeiro (WAGLAND, 1978; CORDOVÉS, 1996). Após a fixação, a larva alimenta-se de linfa (CASTRO & PEREIRA, 1946) e, em aproximadamente sete dias, se dá a muda para o estágio de ninfa. Em torno de 15 dias após o início da infestação, ocorre uma nova muda, onde se inicia o processo de dimorfismo sexual. No estágio adulto, a fêmea inicia o repasto sangüíneo. Após copular com o macho, a fêmea aumenta o volume de sangue que ingere, o que resulta no aumento do seu peso em até 200 vezes. O ciclo culmina com o desprendimento da fêmea ingurgitada do bovino (~18 dias pós-infestação) e sua queda ao solo (LONDT & ARTHUR, 1975), geralmente ao amanhecer (CORDOVÉS, 1996). O macho, cerca de 10 vezes menor que a fêmea, permanece no bovino e procura nova fêmea para

acasalar. No solo, a fêmea ingurgitada procura um local protegido da luz solar para a postura (NEWTON, 1967). O período de pré-postura é influenciado pelo volume de sangue ingurgitado (NAGAR, 1968) e pela temperatura ambiente (OLIVEIRA *et al.* 1974), durando em média de dois a três dias. Em condições de laboratório, com temperatura de 28<sup>o</sup>C e umidade relativa de 85%, a fêmea realiza a postura de ovos equivalendo a 55% do seu peso (LARANJA, 1979). Em aproximadamente 18 dias ocorre a eclosão das larvas em mais de 90% dos ovos. Quando eclode, a larva é extremamente ativa e migra, por geotropismo negativo, para a extremidade superior do pasto, onde localiza o hospedeiro pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, pelo estímulo visual e pelo gradiente de concentração de CO<sub>2</sub> (SONENSHIME, 1993). O tempo de sobrevivência da larva que não encontra um hospedeiro é influenciado pela temperatura e pela umidade relativa do ambiente (LONDT & WHITEHEAD, 1972). A Figura 1.3 reinterpreta ciclo de vida do carrapato *B. microplus*.

Os fungos são relatados como os principais patógenos de carrapatos devido à sua vasta dispersão, seu vasto espectro de hospedeiros e sua capacidade de penetração ativa via cutícula. Estudos indicam que a infecção por fungo pode causar a morte de até 50% da população de carrapatos (KALSBECK *et al.*, 1995). No entanto, somente seis gêneros de fungos são conhecidos por atacar carrapatos: onze espécies de *Aspergillus*, três espécies de *Beauveria*, três espécies de *Fusarium*, uma espécie de *Paecilomyces*, três espécies de *Verticillium* e *M. anisopliae*, que é o único que não foi isolado naturalmente infectando carrapatos (TANADA & KAYA, 1993) Os fungos entomopatogênicos mais investigados para o controle biológico de carrapatos são os pertencentes aos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, principalmente por sua habilidade em germinar em umidade relativamente baixa. Várias espécies de carrapatos foram infectadas por *M. anisopliae* e *B. bassiana* com resultados satisfatórios (BARCI, 1997). Borrifando-se bovinos infestados com carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus*, suspensões de esporos destes fungos causaram 76-85% de mortalidade dos parasitas, uma redução na fecundidade de 85-99% e uma redução na eclosão das larvas de 94-100%. *M. anisopliae* parece ser superior a *B. bassiana*, causando até 85% de mortalidade (KAAYA *et al.*, 1996). *M. anisopliae* mostrou-se altamente patogênico contra carrapatos da espécie *I. scapularis*, causando 100% de mortalidade de larvas e fêmeas ingurgitadas (ZHIOUA *et al.*, 1997). Os autores mostraram que este resultado está diretamente relacionado com a concentração de esporos.

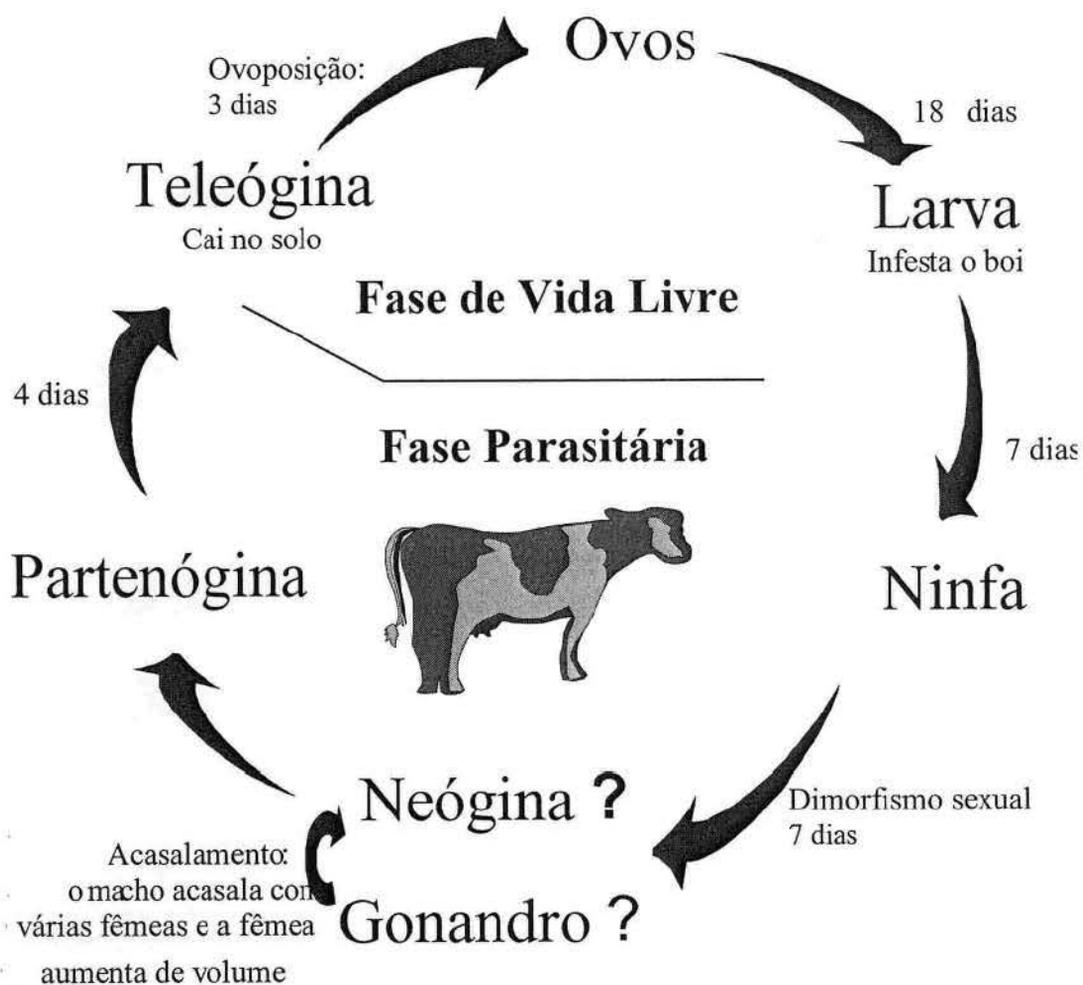


Figura 1.4 Ciclo de vida do carrapato *Boophilus. microplus* (baseada em NEWTON, 1967).

Os efeitos do fungo *M. anisopliae* foram bem mostrados *in vitro* sobre fêmeas do carrapato *B. microplus* e seus ovos, causando tanto mortalidade quanto redução na fecundidade e na eclosão das larvas (ALVES *et al.*, 1993; BITTENCOURT *et al.*, 1994a e b; MONTEIRO *et al.*, 1998; FRAZZON *et al.*, 2000).

CORREIA *et al.*, (1998) testaram os efeitos do fungo *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus in vivo*. FRAZZON *et al.*, (2000) testaram os efeitos do fungo *M. anisopliae* sobre fêmeas do carrapato *B. microplus*, com isso mostrou que esse fungo causa mortalidade e redução na fecundidade e na eclosão das larvas. Os autores mostraram que a mortalidade de fêmeas ingurgitadas e de larvas é semelhante *in vitro* e *in vivo*. O fungo não diminuiu o peso das fêmeas ingurgitadas nem a porcentagem de ovoposição *in vivo*, mas apresentou uma alteração significativa no período de postura. Os resultados mostrados motivam a realização de novas investigações para provar o potencial de *M. anisopliae* como biocontrolador do carrapato *B. microplus*, pois não foi observada a redução no número total de fêmeas que continuaram a parasitar os bovinos

## 1.5 OBJETIVOS

O presente trabalho faz parte do objetivo geral do laboratório que é determinar a participação de genes específicos no processo de infecção de *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus*. Nesta etapa estamos avaliando a participação da protease PR1A no processo. Objetivamos verificar se a expressão aumentada da protease PR1A tem algum efeito no processo de penetração de *M. anisopliae* no *B. microplus*.

Para alcançar este objetivo desenvolveremos as seguintes etapas:

1. Obter linhagens transformadas de *M. anisopliae* superexpressando a protease PR1A.
2. Avaliar a produção da protease PR1A nos transformantes.
3. Realizar Bioensaios, em laboratório, com as linhagens transformadas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ORGANISMOS E PLASMÍDEOS

#### 2.1.1 Linhagem de *Metarhizium anisopliae*

| Linhagem                      | Características  | Estado de origem | Fonte                                 |
|-------------------------------|--|------------------|---------------------------------------|
| E <sub>6</sub> S <sub>1</sub> | Reisolada de <i>Deois flavopicta</i> . Não infectada por dsRNA | Espírito Santo   | Centro de Biotecnologia UFRGS, Brasil |

#### 2.1.2 Plasmídeos

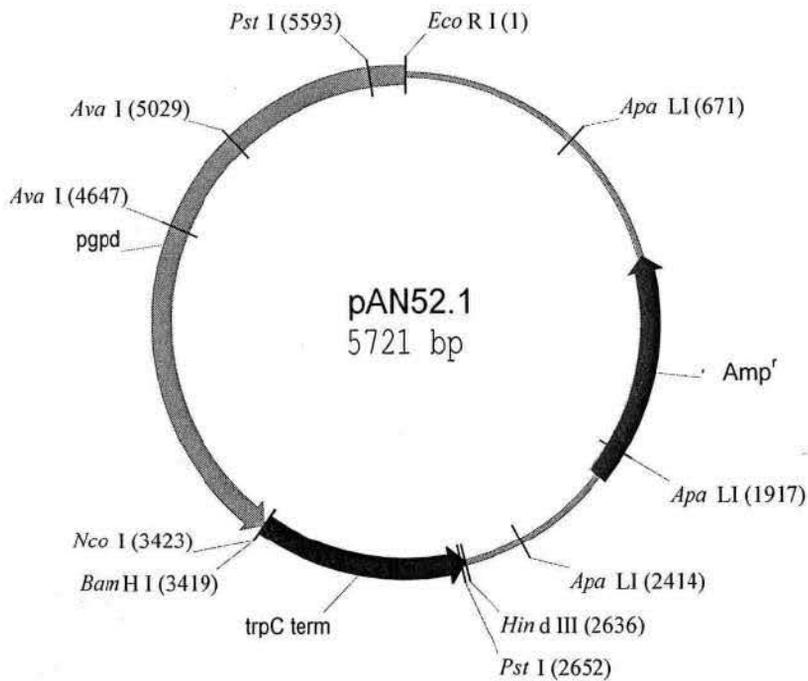
| Plasmídeo | Mapa     | Cepa Hospedeira    | Marca            | Fonte                       |
|-----------|----------|--------------------|------------------|-----------------------------|
| PAN52.1B  | Fig. 2.1 | DH5 $\alpha$       | Amp <sup>r</sup> | PUNT <i>et al.</i> , 1987   |
| pBT6      | Fig. 2.2 | DH5 $\alpha$ e TG2 | Amp <sup>r</sup> | ORBACH <i>et al.</i> , 1986 |

## 2.2 MEIOS DE CULTURA

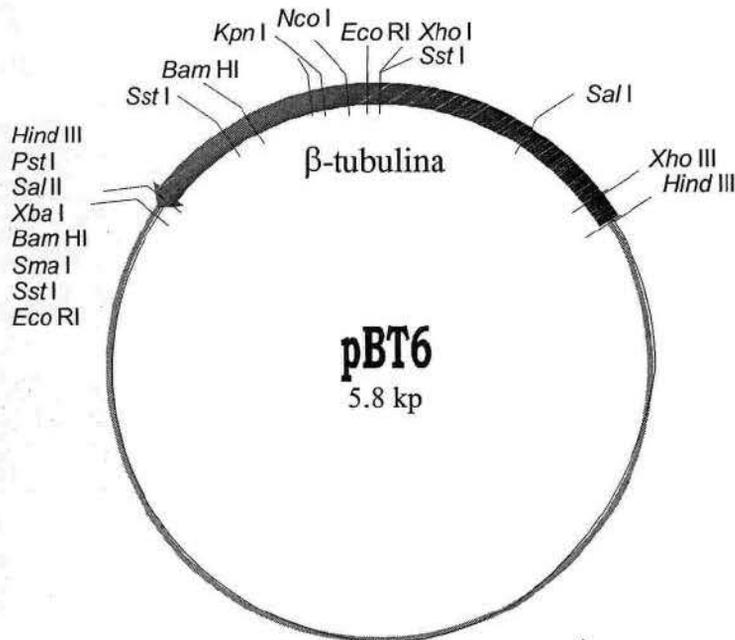
A concentração dos componentes dos meios está descrita por litro. Os meios foram preparados por diluição dos componentes em água destilada. A esterilização foi realizada por autoclavagem (20 minutos a 120°C e 1 atm) ou por filtração (através de membrana de nitrocelulose de 0,22  $\mu$ m) como requerido. Para meios sólidos, foram adicionados 15 g/l de bacto-agar (GIBCO BRL).

#### 2.2.1 Meio de Cove (MC)

|                   |     |
|-------------------|-----|
| NaNO <sub>3</sub> | 6g  |
| Glicose           | 10g |



**Figura 2.1** Mapa físico do vetor plasmidial **pAN52.1***Bam*HI (PUNT *et al.*, 1987). Amp<sup>r</sup>, resistência a ampicilina. trpC term, terminador do gene *trpC* de *A. nidulans* (codifica indolil-glicerol sintetase). Pgpd, promotor do gene *gpd* de *A. nidulans* (codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). O sítio de



**Figura 2.2** Mapa físico do vetor plasmidial **pBT6** (ORBACH *et al.*, 1986). A flecha representa a direção da transcrição do gene  $\beta$ -tubulina.

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH. O meio foi autoclavado, resfriado a 45°C e adicionado de 20 ml de solução de sais de Cove estéril:

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| KCl                                   | 26 g |
| MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O | 26 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 76 g |

e 0,4 ml de solução de elementos-traço estéril:

|  |        |
|--|--------|
| Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10 H <sub>2</sub> O | 0,04 g |
| CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O                              | 0,4 g  |
| FeSO <sub>4</sub>  | 0,01 g |
| MgSO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O                              | 0,8 g  |
| ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O                              | 0,8 g  |

### 2.2.2 Meio de Cove completo (MCc)

Meio Cove (2.2.1) suplementado com 2 g de peptona, 1,5 g de casaminoácido (DIFCO) e 0,5 g de extrato de levedura.

### 2.2.3 Meio Luria-Bertani (LB)

|                     |      |
|---------------------|------|
| Triptona            | 10 g |
| Extrato de Levedura | 5 g  |
| NaCl                | 10 g |

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH antes da autoclavagem.

### 2.2.4 Meio com leite

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Leite em pó             | 10 g  |
| Extrato de Levedura     | 1 g   |
| Vermelho de Bromocresol | 0,1 g |

O pH foi ajustado para 8 com NaOH antes da autoclavagem.

### 2.2.5 Meio com Glicose

Glicose (1%)

## 2.2.6 Meio com Cutícula

Cutícula do carrapato *Boophilus microplus* (1%)

## 2.3 REAGENTES

Para preparar as soluções e os tampões foi usada água destilada. Ambos foram autoclavados por 20 minutos a 120°C e 1 atm, preparados usando água autoclavada ou filtrados com membrana de nitrocelulose 0,22 µm. Os antibióticos e as enzimas (Sigma) foram preparados, estocados e usados da forma e na concentração sugeridas por SAMBROOK *et al.* (1989) ou de acordo com o protocolo sugerido pelos fabricantes.

### 2.3.1 Antibiótico

A ampicilina foi dissolvida em água destilada na concentração de 50 mg/ml e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

### 2.3.2 Enzimas

Foi utilizada 1 U de endonucleases para digerir 1 µg de DNA, em 2-3 horas, no tampão e na temperatura recomendados, em um volume final de 30 µl. As enzimas de restrição, a DNA-ligase de T4, a DNA-polimerase I e o fragmento de Klenow tiveram por origem Amersham/Pharmacia, CenBiot (Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul) e GIBCO BRL. Solução estoque de Ribonuclease A (RNase A; Sigma) foi preparada e utilizada segundo SAMBROOK *et al.* (1989; 10 mg/ml). Proteinase K (Sigma) foi dissolvida em água numa concentração de 20 mg/ml. Aliquotas de 100 µl foram estocadas a - 20 °C.

### 2.3.3 Soluções e Tampões

#### 2.3.3.1 Solventes orgânicos

##### 2.3.3.1.1 Fenol

Antes de ser utilizado, o fenol redestilado e saturado com água foi equilibrado com 1 M Tris.HCl, pH 8 a T<sub>amb</sub>. O Fenol saturado com água foi mantido a - 20°C e o equilibrado a 4°C.

Fenol/Clorofórmio

Foram misturadas partes iguais de fenol equilibrado (2.3.3.1) e clorofórmio. A mistura foi mantida a 4 °C e protegida da luz.

#### **2.3.3.1.2 Clorofórmio/Álcool isoamílico**

Foram misturadas 24 partes de clorofórmio para cada parte de álcool isoamílico.

#### **2.3.3.2 Tampão de amostra para ácidos nucleicos**

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Azul de Bromofenol | 2,5 g |
| Xilenocianol FF    | 2,5 g |
| Ficoll             | 150 g |

Os reagentes foram diluídos em água, o Ficoll utilizado foi o tipo 400 da Pharmacia e o tampão foi armazenado a  $T_{amb}$ .

#### **2.3.3.3 Tampão de extração (TEX)**

200 mM Tris.HCl, pH 8,0  
50 mM EDTA, pH 8,2  
SDS 1%

#### **2.3.3.4 Tampão TE (Tris – EDTA)**

10 mM Tris.HCl, pH 8  
1 mM EDTA, pH 8,2

#### **2.3.3.5 Tampão Tris-Borato (TBE) 5X**

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Trizma base     | 108 g |
| Ácido Bórico    | 55 g  |
| EDTA 0,5 M pH 8 | 40 ml |

A solução estoque foi diluída no momento do uso para 1x com água destilada.

#### **2.3.3.6 Tampão acetato**

Ácido Acético 200 mM  
Acetato de Sódio 200 mM  
O pH foi ajustado para 5,4 com NaOH.

### 2.3.3.7 Soluções para PCR

#### 2.3.3.7.1 dNTP

Soluções estoque de desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), na concentração de 50 mM, foram diluídas em água *miliQ* autoclavada e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A solução de uso, na concentração de 0,5 mM, foi mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.3.7.2 Primers

Oligonucleotídeos foram construídos baseados nas ORFs dos genes publicados e disponíveis no *GenBank* e sintetizados pela *Oligos Etc. Synthesis*. Os primers são: 1# - 5' CCCGGGATGCATCTGTCTGCCCTTCT 3' e 2# - 5'.GGATCCGAGAGCATCTAAATAAGTCC. Uma solução estoque 50 nM, em água, foi mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  e alíquotas de 0,5 nM foram mantidas para uso diário, também a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.3.8 Soluções para géis

#### 2.3.3.8.1 Acrilamida (30%)

Acrilamida 30%

N-N'-bis-metilenoacrilamida 0,8%

Dissolvidos em água destilada. A solução foi deionizada com 5% de Amberlite durante 1 hora, com agitação, a  $T_{\text{amb}}$  e filtrada. Foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  e protegida da luz.

#### 2.3.3.8.2 Acrilamida (42%)

Acrilamida 42%

N-N'-bis-metilenoacrilamida 1,8%

Dissolvidos em água destilada. A solução foi deionizada com 5% de Amberlite durante 1 hora, com agitação, a  $T_{\text{amb}}$  e filtrada. Foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  e protegida da luz.

### 2.3.4 Eletroforese

#### 2.3.4.1 Géis de agarose

Análises em eletroforese de gel de agarose, corado com brometo de etídio e visualizado por irradiação ultravioleta (UV), foram realizadas utilizando vários tamanhos e

concentrações de gel, dependendo da aplicação específica. Os géis foram preparados e a eletroforese procedida de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989).

## 2.3.4.2 Géis de poliacrilamida

### 2.3.4.2.1 Géis de seqüenciamento

|                  |         |
|------------------|---------|
| Acrilamida (42%) | 16,6 ml |
| Uréia            | 42 g    |
| TBE 5X           | 20 ml   |

Os reagentes foram misturados com água destilada sob agitação até total dissolução.

Foram polimerizados com:

|           |        |
|-----------|--------|
| APS (25%) | 300 µl |
| TEMED     | 70 µl. |

Os géis foram deixados polimerizando entre as placas da cuba de seqüenciamento por toda à noite.

#### 2.3.4.2.1.1 Secagem do gel

Os géis foram transferidos para papel filtro 3 MM, 3 camadas, de mesmo tamanho e cobertos com filme plástico. Foram deixados secar a 80 °C por 1,5 hora, e expostos a filme de Raio-X (Kodak Diagnostic Film – X-Omst<sup>tm</sup> K XK-1).

### 2.3.4.2.2 Géis desnaturantes (SDS-PAGE) 12%

#### 2.3.4.2.2.1 Géis de corrida

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Tris.HCl 1,5 M, pH 8,8 | 2,5 ml |
| SDS 10%                | 100 µl |
| Acrilamida 30%         | 4 ml   |
| TEMED                  | 5 µl   |
| APS 25%                | 50 µl  |
| Água q.s.p.            | 10 ml. |

#### 2.3.4.2.2.2 Géis de empilhamento

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Tris.HCl 0,5 M, pH 6,8 | 2,5 ml  |
| SDS 10%                | 100 µl  |
| Acrilamida 30%         | 1,33 ml |
| TEMED                  | 10 µl   |
| APS 25%                | 50 µl   |
| Água q.s.p. 10 ml.     |         |

#### 2.3.4.2.2.3 Tampão de amostra (5 X)

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Tris.HCl 0,5 M, pH 6,8 | 1 ml   |
| Glicerol               | 0,8 ml |
| SDS 10%                | 1,6 ml |
| β-mercaptoetanol       | 0,4 ml |
| Azul de Bromofenol 1%  | 0,4 ml |
| Água q.s.p. 8 ml.      |        |

#### 2.3.4.2.2.4 Tampão de corrida (5X)

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Trizma base           | 9 g    |
| Glicina               | 43,2 g |
| SDS                   | 3 g    |
| Água q.s.p. 1.000 ml. |        |

#### 2.3.4.2.2.5 Coloração dos géis

Todos os passos foram procedidos sob agitação e a  $T_{amb}$ .

Os géis desnaturantes foram corados em solução corante Azul de Coomassie, CBB G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1988),

40% de Metanol

0,1% de Azul de Coomassie CBB G-250

10% de Ácido acético,

sob agitação, a  $T_{amb}$ , durante uma noite e descorados com solução,

10% de Ácido acético

40% de Metanol.

### **2.3.5 Soluções para medidas de atividade enzimática de Protease do tipo subtilisina**

#### **2.3.5.1 Substrato utilizado**

O substrato teve origem Sigma e foi utilizado na concentração de 50 mM. O substrato foi N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7-Amido-4-Metilcoumarina, para subtilisinas. As soluções estoque foram diluídas em dimetilformamida (DMFA). Utilizou-se uma concentração final de 1 mM de substrato, diluída com água, para cada ensaio enzimático.

#### **2.3.5.2 Tampão da reação**

Tris.HCL 50 mM, pH 7,4

CaCl<sub>2</sub> 20 mM

## **2.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

### **2.4.1 Cultivo e manutenção dos organismos**

#### **2.4.1.1 *Metarhizium anisopliae***

Esporos de *M. anisopliae* (2.1.1) foram cultivados em meio de Cove completo (2.2.2) sólido em placas de Petri, repicados pelo método de ponto e incubados por 7 dias a 28°C e estocados a 4°C por um período de até duas semanas. A suspensão de esporos foi preparada ressuspensando os esporos em solução estéril de 0,1% Tween 80, usando alça de vidro. A suspensão foi transferida para tubo estéril com o auxílio de pipeta Pasteur estéril e centrifugado a 5.000 rpm por 7 minutos. Os esporos foram lavados com 40 ml de água destilada estéril por duas vezes, e ressuspensados em água estéril para 10<sup>8</sup> esporos/ml. Os esporos foram contados com auxílio de câmara de Neubauer e a sua esterilidade foi testada em 3 ml de meio LB (2.2.4) líquido. Normalmente inoculou-se 1–5 x 10<sup>6</sup> esporos/ml para as culturas líquidas.

## 2.4.2 Isolamento de DNA

### 2.4.2.1 Extração de DNA de fungo

Esporos do fungo (2.4.1.1) foram inoculados ( $\sim 10^6$  esporos/ml) em 100-500 ml de meio de Cove completo (2.2.2) líquido e incubadas, por três dias a 28°C com agitação, para obtenção de hifas jovens. O micélio foi coletado por filtração, usando papel filtro 1 MM, e lavado duas vezes com água destilada para eliminar o meio de cultura. O excesso de água foi removido do micélio por pressão contra papel filtro 3 MM. O micélio foi congelado e macerado em gral com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O pó foi transferido para tubo Corex e acrescentou-se tampão de extração (10 ml/g de micélio em TEX; 2.3.3.3) e misturou-se até completa homogeneização, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Após 15 minutos de incubação a 70°C, adicionou-se 1 volume de fenol (2.3.3.1.1) tamponado e centrifugou-se a 10.000 rpm durante 10 minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio (2.3.3.1.2). Após nova centrifugação e coleta da fase aquosa, acrescentou-se 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (2.3.3.1.3) e procedeu-se a nova centrifugação (10.000 rpm, 10 minutos). A fase aquosa foi coletada e o DNA foi precipitado com adição de 0,1 volume de NaCl 5 M e 2 volumes de etanol absoluto, estocado a -20°C. Após 2 horas, foi centrifugado (10.000 rpm, 10 minutos), lavado com etanol 70% por três vezes, secado sob vácuo e ressuspenso em 200 µl de tampão TE (2.3.3.4). Os ácidos nucleicos foram estocados a -20°C.

### 2.4.3 Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

O fracionamento de fragmentos de DNA foi feito por eletroforese em gel de agarose (2.3.4.1) num sistema horizontal em gel submerso segundo SAMBROOK *et al.* (1989). Os gradientes de voltagem aplicados foram de 5 a 10 V/cm para um tempo de migração de até 5 horas e de 1,5 a 2 V/cm para um tempo de migração de até 18 horas. As amostras foram preparadas pela adição de tampão de amostra (2.3.3.2), na proporção de 1:10. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador de UV de comprimento de onda curto e, quando necessário, fotografado com câmera *Polaroid MP-4* (667 *Polaroid professional Coaterless B&W Instant Pack Film*) ou com *Kodak Digital Science DC40 Camera*, utilizando o programa *Kodak Digital Science 1D (2.0) – Scientific Imaging Systems*. O tamanho dos

fragmentos de DNA foi estimado com base em marcadores de tamanho molecular conhecidos.

#### **2.4.4 Amplificação de DNA de *Metarhizium anisopliae***

A amplificação de DNA de *M. anisopliae* foi realizada pela técnica de PCR, que foi otimizada em nosso laboratório para o gene de interesse. As condições de amplificação do gene *pr1A* a partir do DNA genômico de *M. anisopliae*, sendo essas estabelecidas no termociclador PTG-200 num volume final de reação de 25 $\mu$ l contendo Tris.HCl a 10mM, pH 8,3/Mgcl<sub>2</sub> a 1,5mM/KCl a 50mM/0,2mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTPs)/50pmol de cada primer (*pr1A#1* e *pr1A#2*)/ 0,5U de Taq DNA-polimerase (pharmacia). As reações foram realizadas com um ciclo de desnaturação a 94°C (5 minutos), anelamento a 53°C (30 segundos) e polimerização a 72°C (2 minutos), seguidos de 30 ciclos a 94°C (1 minuto), anelamento a 53°C (30 segundos) e polimerização a 72°C (2 minutos), finalizando com mais um ciclo a 94°C (1 minuto), anelamento a 53°C (30 segundos), polimerização a 72°C (10 minutos) e 4°C (10 minutos).

#### **2.4.5 Purificação dos produtos de PCR**

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram cortados do gel de agarose 1 % (2.3.4.1) e purificados pelo *kit Concert Rapid Gel Extraction Systems (GIBCO BRL)*.

#### **2.4.6 Digestão de DNA com enzimas de restrição**

A digestão de DNA com endonucleases de restrição foi normalmente realizada como descrito em 2.3.2. A verificação da clivagem foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Em alguns casos, nessas condições, foram obtidas digestões parciais de DNA. Para a obtenção do resultado desejado, foi adicionada mais 1 U de enzima e a reação foi novamente incubada, nas condições ótimas, por mais um período de 30 minutos. Em reações de clivagem dupla, após a clivagem com a primeira enzima, o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio (2.3.3.1.2), precipitado com etanol e ressuspenso no tampão de clivagem da segunda enzima.

## **2.4.7 Transformação mediada por DNA**

### **2.4.7.1 Transformação de *Metarhizium anisopliae***

O método utilizado para transformação do fungo *M. anisopliae* foi o de biolística de acordo com ST LEGER *et al.*, (1995). Os transformantes foram selecionados por resistência a benomil por terem sido co-transformados com o plasmídeo pBT6 (2.1.2). Para verificação da estabilidade mitótica dos transformantes cada colônia resistente a benomil foi submetida a passagens sucessivas em meio não seletivo e simultâneo crescimento em meio com pressão seletiva (benomil a 7 µg/ml). Os clones estáveis foram submetidos à reação de PCR (2.4.4) para confirmação da transformação, utilizando *primers* específicos para os vetores utilizados.

### **2.4.7.2 Análise dos transformantes**

#### **2.4.7.2.1 Medida do halo de degradação**

As colônias transformantes foram testadas em relação à linhagem selvagem do fungo *M. anisopliae* para verificar a expressão aumentada das proteases. Elas foram cultivadas em placas de Petri com meio de leite (2.2.5), para proteases, por até sete dias. O diâmetro do halo de degradação em relação ao diâmetro da colônia foi medido em pH ótimo para as proteases estudadas com o auxílio de uma régua.

#### **2.4.7.2.2 Análise do sobrenadante**

As linhagens transformantes e selvagens foram crescidas em meio de Cove completo (2.2.2) por 48 horas a 28°C com agitação. O micélio foi filtrado, lavado, seco e pesado. Dois gramas de micélio foram transferidos para meio para indução de proteases (2.2.3; ST. LEGER *et al.*, 1993) complementado com 0,5% de cutícula de *B. microplus* e cultivada com agitação a 28°C por 48 horas. O micélio foi separado do sobrenadante por filtração, lavado e seco. Ambos foram congelados a -20°C. O sobrenadante foi dialisado (2.4.2.2.1) e submetido à análise enzimática (2.4.12.2.2) e em gel de SDS/PAGE (2.4.12.2.3).

##### **2.4.7.2.2.1 Diálise**

As membranas de diálise de exclusão de 8.000 (Sigma) foram fervidas por 30 minutos em solução de 1% de carbonato de cálcio e 0,1% de EDTA, lavadas em água destilada e estocadas em etanol 70%. Antes de serem utilizadas foram lavadas em água destilada. As

amostras foram dialisadas contra tampão acetato a 10 mM pH 5,4 (2.3.3.6) pelo tempo mínimo de 24 horas a 4°C. O volume de tampão utilizado foi de 100 vezes o volume da amostra.

#### **2.4.7.2.2.2 Ensaios enzimáticos**

##### **2.4.7.2.2.2.1 Determinação de proteínas totais**

As concentrações de proteínas totais presentes no sobrenadante dialisado de meio de indução com as linhagens selvagem ou transformantes de *M. anisopliae* foram medidas pelo método de BRADFORD (1976) e modificado para microensaio. A curva padrão foi determinada com BSA.

##### **2.4.7.2.2.2.2 Atividade específica**

A atividade de protease do tipo subtilisina dos sobrenadantes foi medida em *Spectra Max 250* (Molecular Devices) e lido em *SofMax Pro*. Ensaios cinéticos foram realizados, utilizando substrato peptídico sintético para protease do tipo subtilisina cromogênico (N-Ala\_ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide).

##### **2.4.7.2.2.3 Análise em géis desnaturantes (SDS-PAGE)**

A análise das proteínas induzidas em gel desnaturante (2.3.4.2) foi realizada segundo SAMBROOK *et al.*, (1989). A concentração do gel foi de 12%. As amostras foram migradas por 1 hora e 30 minutos a 100 V e o gel foi corado com Comassie blue G-250 (2.3.5.2) durante 16 horas e descorado com solução de ácido acético 10% e metanol 40%. Uma alíquota contendo 100 µg de proteínas totais foi precipitada com TCA 20% da saturação, durante 17 horas. Após centrifugação (10.000 rpm por 30 minutos) o sedimento foi lavado com acetona (1 ml; centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm) por duas vezes e ressuspendido em 16 µl de água destilada. Em seguida foi misturado a 4 µl de tampão amostra 5x concentrado e fervido por 2 minutos. As amostras foram aplicadas em gel desnaturante SDS/PAGE a 12% (2.3.4.2.2).

### **2.4.7.2.3 Hibridização**

Os experimentos de *Southern Blot* foram realizados de acordo com o sistema de marcação direta e detecção de ácidos nucléicos ECL™ (Amersham/ Pharmacia Biotech).

### 3 Resultados

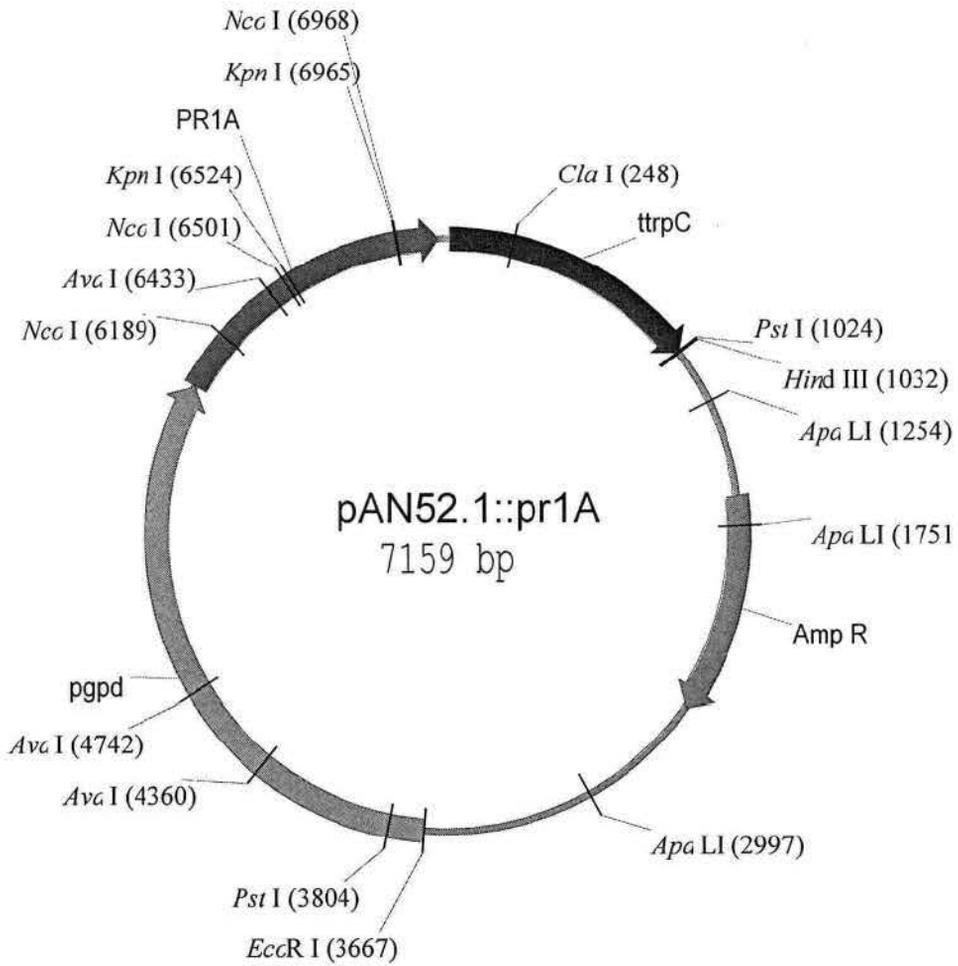
Visando estudar a expressão do gene *pr1A* (ST. LEGER *et al.*, 1992 a) de *Metarhizium anisopliae* durante a infecção do carrapato *Boophilus micropulus*, K FAILLACE (dados não publicados), no laboratório de fungos filamentosos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, realizou a extração de RNA total de *M. anisopliae* cultivado em meio MCc (2.2.2) e purificou RNA poli (A<sup>+</sup>). A partir de RNA poli (A<sup>+</sup>), K. FAILLACE sintetizou a primeira fita de cDNA e amplificou o fragmento correspondente ao gene *pr1A* por PCR. Utilizando primers flanqueando as ORFs do gene (GenBank AJ251925): Depois de ter isolado o cDNA de gel de agarose e confirmar por sequenciamento a presença de seqüência correspondente ao gene *pr1A*, esta foi clonada no vetor pUC18. Com o objetivo de testar a superexpressão de genes relacionados com a infecção do fungo *M. anisopliae* nos seus hospedeiros, o gene *pr1A* foi clonado no vetor pAN52.1*Bam*HI (2.1.3). Este vetor foi modificado do vetor pAN52.1 de PUNT *et al.*, (1987) e apresenta promotor constitutivo do gene *gpd* e terminador do gene *trpC*, ambos do fungo *Aspegillus nidulans*. Esse vetor, também confere resistência ao antibiótico ampicilina (FRAZZON., 2002). Na Figura 3.1, pode ser visualizado o mapa físico da construção do vetor pAN52.1*Bam*HI*pr1A*.

#### 3.1 Construção das linhagens de *Metarhizium anisopliae* superexpressando a protease PR1A

#### 3.2 Transformação do fungo *Metarhizium anisopliae*

As linhagens de *M. anisopliae* selvagens foram co-transformadas através do método de Biobalística (ST. LEGER *et al.*, 1995). A escolha do método para a co-transformação foi feita por experimentos realizados por BOGO *et al.*, (1996 a), onde foram comparados três métodos para transformação sendo o mais eficiente o método de biobalística.

A transformação foi realizada para introduzir o gene *pr1A* clonado no vetor de expressão para fungos pAN52.1*Bam*HI no fungo *M. anisopliae*. Foi realizada a co-transformação com o plasmídeo pBT6, que contém o gene de resistência a benomil, previamente descrito para *M. anisopliae*, como marcador seletivo dominante (BERNIER *et al.*, 1989; GOETTEL *et al.*, 1990; ST LEGER *et al.*, 1992 a; BOGO *et al.*, 1996 a), possibilitando a seleção dos transformantes.



**Figura 3.1** Mapa físico da construção pAN52.1*Bam*HI*pr1A*. Amp<sup>R</sup>, resistência a ampicilina. trpC term, terminador do gene trpC de *A. nidulans*. Pgpd, promotor do gene *gpd* de *A. nidulans*. Pr1A, gene *pr1A* de *M. anisopliae*. Os sítios de restrição para enzimas estão indicados pelo nome da enzima.

O fungicida benomil liga-se a  $\beta$ -tubulina e inibe a formação de microtúbulos. Mutações no gene *benA3* de *Aspergillus nidulans*, no qual codifica a maioria das  $\beta$ -tubulinas expressadas nas hifas, assim podendo conferir resistência a benomil (GOETTEL *et al.*, 1989).

Foram utilizadas as condições descritas (2.4.9.1) para a transformação de *M. anisopliae*, sendo que a relação molar entre o vetor de seleção e o vetor de expressão foi de 20:1 (ST LEGER *et al.*, 1992 a). Após a biobalística as colônias foram plaqueadas em meio seletivo MCc (2.2.2) adicionado de benomil (7 $\mu$ g /ml). Assim as colônias que se desenvolveram em até trinta dias foram consideradas como possíveis transformantes e posteriormente avaliadas. Observou-se que entre os possíveis transformantes existe diferença no tamanho, na coloração, na esporulação e algumas vezes na morfologia das colônias.

Foram selecionados 54 possíveis colônias transformantes para pBT6:pAN52.1Bpr1A, com uma eficiência de transformação 351 transformantes por  $\mu$ g de DNA. Na Figura 3.2 é possível a observação destas diferenças das colônias em meio seletivo (MCc sólido adicionado de 7 $\mu$ g/ml de benomil).

### 3.2.1 Análise das linhagens co-transformadas de *M. anisopliae*

Após a co-transformação, as colônias crescidas em meio seletivo foram testadas para avaliar a sua estabilidade mitótica, teste realizado como descrito (2.4.11.2). A eficiência de co-transformação foi de 12% de possíveis transformantes, no qual a estabilidade mitótica foi de 30% de possíveis transformantes estáveis para a resistência ao benomil.

Para avaliar a produção da protease PR1A nos transformantes foram feitas duas triagens, de forma a eliminar os possíveis transformantes que tivessem a expressão da proteína PR1A semelhante à linhagem selvagem.

Primeiramente, avaliou-se o halo de degradação da cepa selvagem e dos transformantes em meio de cultura contendo substrato para protease (2.2.5). Contudo, confirmou-se o pH ótimo para a atividade das proteases (ST LEGER *et al.*, 1999) dos possíveis transformantes foram analisados a partir de três séries de transferências no meio de cultura contendo substrato para proteases. A Tabela 3.1 e a Figura 3.4 apresentam os resultados obtidos nesse Teste. Analisando estatisticamente os dados obtidos através do Teste de Tukey, para  $\alpha = 0,05$ , foi encontrado que as linhagens apresentam crescimento semelhante, representado pelo diâmetro da colônia e que os transformados T246, T245 e T01 produzem estaticamente mais protease que a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>.

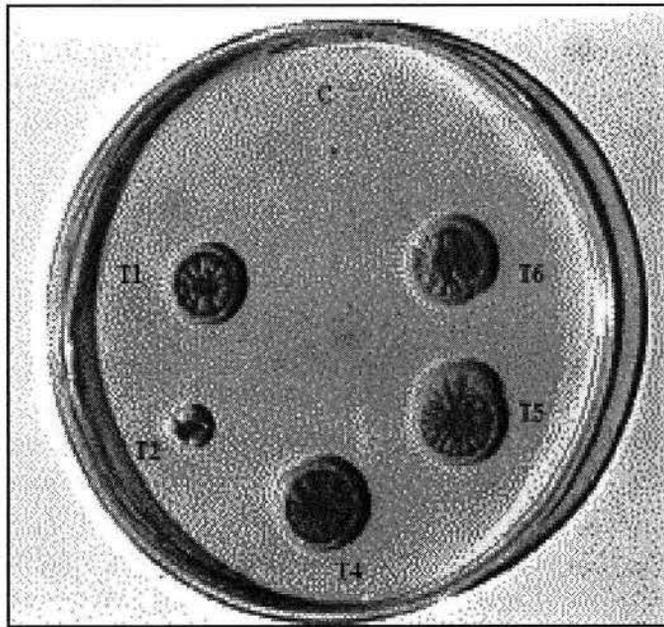


Figura 3.2 Teste com possíveis transformantes e Linhagem selvagem em meio MCC adicionado de benomil . C-*M. anisopliae* E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> selvagem; T1, T2, T3, T4, T5 e T6- Possíveis transformantes pBT6:pAN52.1Bpr1A do fungo *M. anisopliae* E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>. As colônias foram inoculadas, pelo método de ponto, e cresceram em meio MCC (2.2.2) suplementado com 7µg/ml de benomil, por um período de 10 dias a 28°C.

Na segunda triagem, para avaliação da expressão da protease PR1A nos transformantes de *M. anisopliae*, 10<sup>6</sup> esporos das cepas transformantes ou selvagem foram inoculados em meio MCc. Após, o crescimento da massa micelial, esta foi pesada, e transferida para meio contendo glicose (2.2.5) para o primeiro ensaio. Para o segundo ensaio, o micélio foi transferido para meio contendo cutícula do carrapato *Boophilus microplus* (2.2.6).

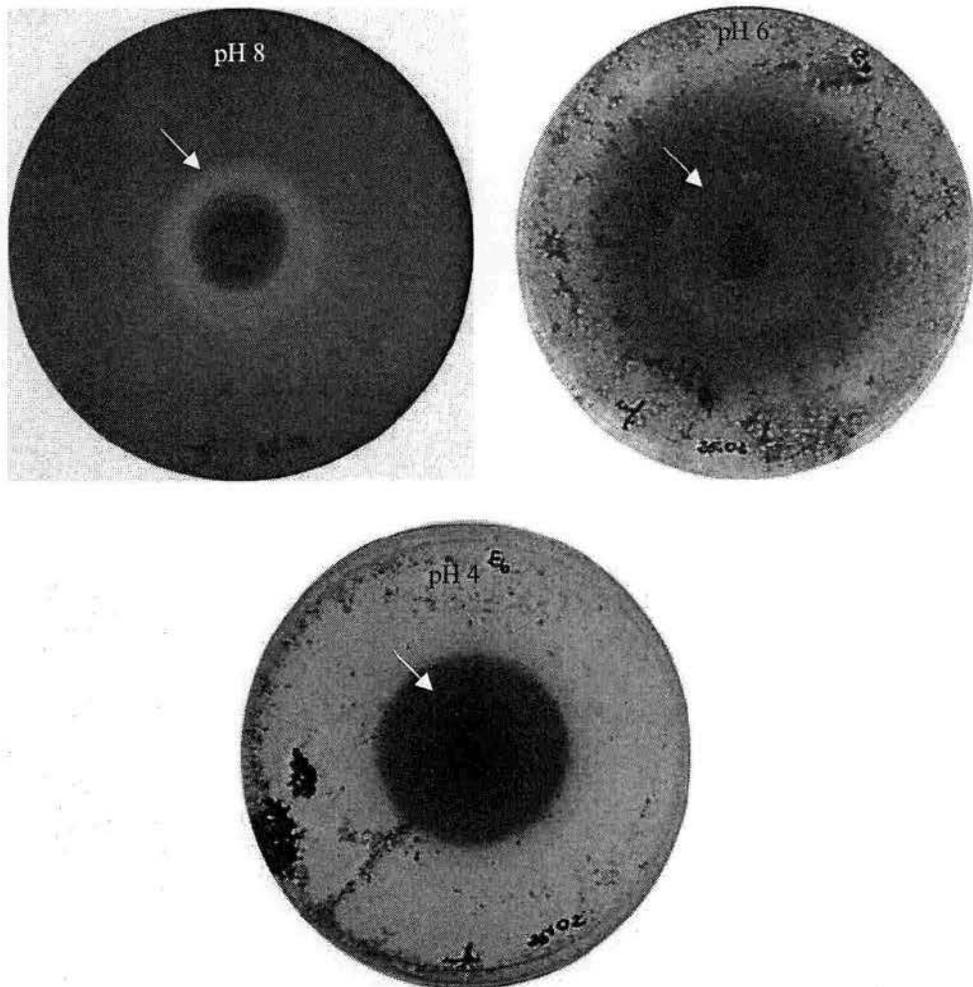
Para análise da atividade enzimática de proteases foi realizado ensaio específico no sobrenadante das culturas com substrato para proteases do tipo subtilisina (2.4.9.2.2.2.2). Foram realizados três repetições de cada ensaio específico, no qual três dos transformantes analisados tiveram diferença estatisticamente significativa, a partir do teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ . As Tabelas 3.2 e 3.3 apresentam as médias das três repetições da cepa selvagem e dos transformantes selecionados nos ensaios, com os respectivos meios de cultura contendo glicose ou cutícula do carrapato *B. microplus*. O Padrão de expressão de proteínas totais da linhagem selvagem e das linhagens transformantes cultivadas em meio contendo glicose foi analisado em SDS-PAGE 12% (2.3.4.2.2). Alíquota de sobrenadante foram desnaturadas e foi constatado que o T245 expressou menor quantidade de Proteínas totais.

Os três transformados analisados e a linhagem selvagem expressaram proteína de massa molecular, aproximada de 29KDa; esperado para PR1A excretada, sendo que os transformantes T1 e T246 expressaram essas proteínas em maior quantidade. O padrão de banda do E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> em comparação aos outros transformantes é diferente, pois é possível a observação de diferentes proteínas expressas e de proteínas com mais intensidade.

Na Figura 3.5 pode-se observar o padrão de expressão de proteínas totais da cepa selvagem e das linhagens transformadas em SDS-PAGE 12%.

Os possíveis transformantes selecionados, nas duas triagens, foram submetidos a PCR (2.4.4), para determinar se as colônias selecionadas eram transformantes para a construção pAN52.1Bpr1A. A PCR foi realizada com *primers* projetados com base na região do promotor *gpd* e no terminador *trpC* (2.3.3.7.2) de *A. nidulans* do vetor pAN52.1BamHI, que amplificam um fragmento de DNA com apenas alguns pares de bases a mais do que o inserto gene *pr1A*, (1,5Kb). DNA genômico das colônias transformantes selecionadas foi extraído (2.4.2.1), quantificado em gel de agarose a 1% em relação ao marcador de peso molecular conhecido e usado na reação de PCR. Três colônias apresentaram amplificação de um fragmento de DNA de tamanho esperado na PCR, T01bpr1A, t245bpr1A e t246bpr1A,

diferente da linhagem selvagem que não apresentou qualquer banda de amplificação. A reação foi repetida e a partir dela foi realizada a técnica de hibridização por *Southern*, usando como sonda o fragmento de DNA contendo o gene *pr1A*, amplificado por PCR e purificado de gel de agarose. Na técnica de hibridização por *Southern* podemos observar a hibridização de duas bandas, sendo uma delas é do tamanho esperado do gene de interesse *pr1A* (1,5 Kb) e a outra de tamanho molecular de 1,0 Kb. Estes dois fragmentos de hibridização estão no controle positivo, que é o plasmídeo pAN52.1*Bam*HI*pr1A*. A Figura 3.7 A e B mostra, respectivamente, a amplificação do DNA genômico dos transformantes *M. anisopliae* da técnica de PCR e auto-radiografia obtida após a hibridização.



**Figura 3.3 Alcalinização do meio contendo substrato para proteases pela cepa E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> do fungo *M. anisopliae*.** O fungo modifica o pH do meio ao redor da colônia, para exportar as proteases em meio alcalino. As setas apontam os halos de degradação. O meio com leite (2.2.5) utilizado contém vermelho de bromocresol de muda de coloração do amarelo ao violeta conforme o pH (do ácido ao alcalino). As colônias foram repicadas pelo método de ponto e as placas foram incubadas a 28°C por sete dias.

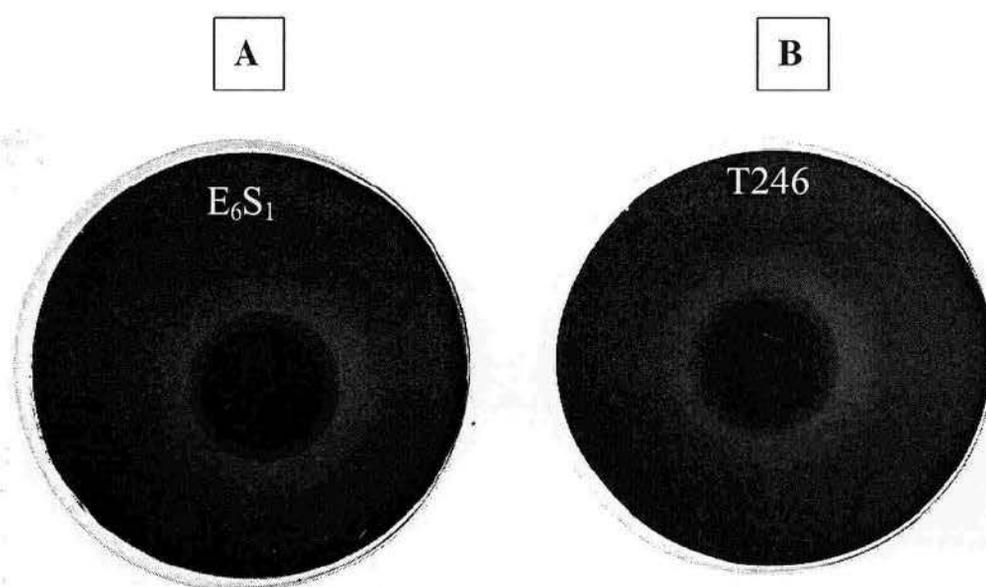
**Tabela 3.1** Medida do Halo de degradação das linhagens selvagem e transformantes do fungo *M. anisopliae* em meio de cultura com substrato para proteases.

| Linhagens | Diâmetro da Colônia <sup>1</sup> | Diâmetro Total <sup>2</sup> | Halo de degradação <sup>3</sup> |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| E6        | 3.59                             | 4.27                        | 0.68                            |
| T1        | 2.94                             | 4.10                        | 1.16                            |
| T245      | 2.83                             | 4.00                        | 1.17                            |
| T246      | 2.46                             | 3.72                        | 1.26                            |

1- Média do tamanho das colônias de três repetições, no qual as colônias foram incubadas por sete dias a 28<sup>o</sup>C.

2- Média do centro da colônia à extremidade da faixa degradada de três repetições.

3- Diferença entre a média do diâmetro da colônia e o diâmetro total.



**Figura 3.4** Halo de degradação em meio com substrato para proteases das cepas selvagem (E6S1) e transformante (T246bpr1A-T246) de *M. anisopliae*. Os procedimentos adotados para o experimento estão descritos em material e métodos. Estas placas foram utilizadas como fonte de dados para a construção da Tabela 3.1.

**Tabela 3.2 Atividade específica de protease. Ensaio cinético com substrato peptídico sintético para subtilisina. Micélio crescido em meio glicose para realização do ensaio.**

| <b>Linhagem<sup>1</sup></b> | <b>pM/ml.min<sup>2</sup></b> | <b>pM/ml.µgPTN<sup>3</sup></b> |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| <b>E6(wt)</b>               | 2,109 ± 0,10                 | 0,30 ± 0,01                    |
| <b>T1</b>                   | 21,676 ± 0,66                | 2,63 ± 0,07                    |
| <b>T245</b>                 | 19,540 ± 0,72                | 2,71 ± 0,08                    |
| <b>T246</b>                 | 24,721 ± 0,51                | 2,99 ± 0,05                    |

1- Linhagens cultivadas em meio contendo glicose, wt- Linhagem selvagem e T1, T245 e T246 linhagens transformadas.

2- Atividade enzimática do sobrenadante com substrato cinético para subtilisina medido em pM/ml em 1 minuto.

3- Atividade específica de protease do tipo subtilisina no sobrenadante medido em pM/ml por .µg de proteínas totais.

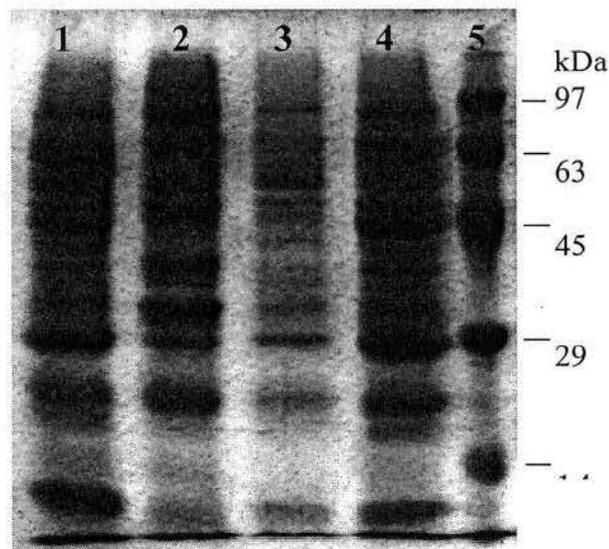
**Tabela 3.3 Atividade específica de protease. Ensaio cinético com substrato peptídico sintético para subtilisina. Micélio crescido em meio cutícula para a realização do ensaio.**

| <b>Linhagens<sup>1</sup></b> | <b>pM/ml.min<sup>2</sup></b> | <b>pM/ml.µgPTN<sup>3</sup></b> |
|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| <b>E6(wt)</b>                | 1,092 ± 0,04                 | 0,16 ± 0,01                    |
| <b>T1</b>                    | 2,292 ± 0,04                 | 0,32 ± 0,01                    |
| <b>T245</b>                  | 7,252 ± 0,13                 | 1,04 ± 0,02                    |
| <b>T246</b>                  | 10,50 ± 0,02                 | 1,57 ± 0,00                    |

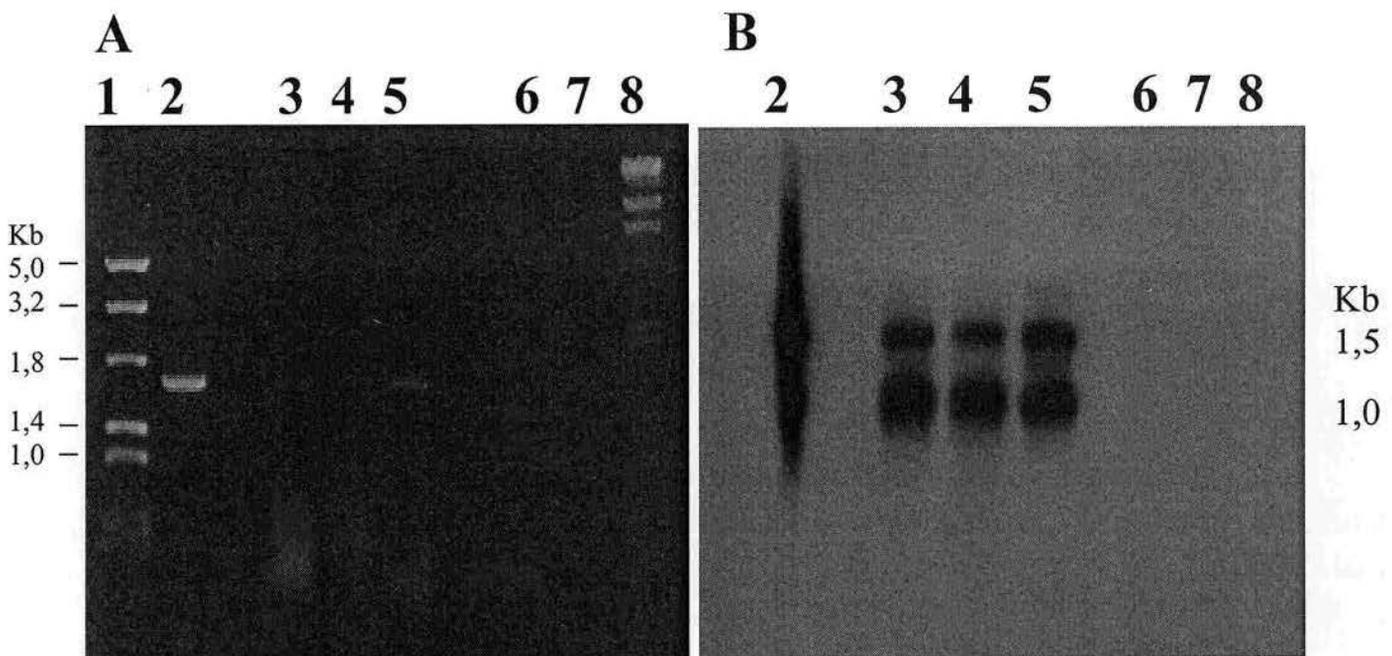
1- Linhagens cultivadas em meio contendo cutícula do carrapato *Boophilus microplus*, wt- linhagem selvagem e T01, T245 e T246 linhagens transformadas.

2- Atividade enzimática do sobrenadante para substrato cinético para subtilisina medido em pM/ml e 1 minuto.

3- Atividade específica de protease do tipo subtilisina no sobrenadante medido em pM/ml por .µg de proteínas totais.



**Figura 3.5** Avaliação das proteínas totais das linhagens selvagem e transformantes de *M. anisopliae* em SDS-PAGE 12%. 1- Proteínas totais do transformante 246. 2- Proteínas totais da linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>. 3- proteínas totais do transformante 245. 4- Proteínas totais do transformante 01.



**Figura 3.6** Modelo de hibridização dos fungos *M. anisopliae* transformantes usando como sonda o gene *pr1A*. (A) Amplificação do DNA genômico dos fungos *M. anisopliae* (B) Autoradiografia obtida após hibridização utilizando como sonda o gene *pr1A*. 1) Marcador de tamanho molecular "Mister M"; 2) Controle positivo, amplificação do DNA plasmidial pAN*pr1A*; 3) Amplificação do DNA genômico do T1; 4) Amplificação do DNA genômico do T245; 5) Amplificação do DNA genômico do T 246; 6) Reação com DNA genômico do selvagem; 7) Controle negativo; 8) Marcador de tamanho molecular I<sup>H</sup>indIII.

## 4 Discussão

O controle biológico tem sido utilizado como alternativa ao controle químico no combate de pragas da agricultura e pecuária. Os fungos filamentosos se destacam, sendo os fungos *Beaveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* os mais utilizados para o controle biológico de pragas da agricultura (KAAYA., *et al.* 1995). O carrapato *Boophilus microplus* é um dos mais importantes ectoparasitas afetando o gado, tanto o brasileiro como o europeu, assim os efeitos do fungo *M. anisopliae*, *in vitro* e *in vivo*, tem sido demonstrado (ALVES *et al.*, 1993, BITTENCOURT., 1994 a, b, MONTEIRO *et al.*, 1997, FRAZZON *et al.*, 2000).

Uma das formas de aumentar a eficiência do fungo *M. anisopliae* como agente biocontrolador é a utilização de conhecimentos básicos para a construção de linhagens mais eficientes. ST. LEGER *et al.*, (1996a) mostraram que a adição de cópias de genes envolvidos no processo de infecção do fungo *M. anisopliae* no genoma do próprio fungo, sob o controle de um promotor constitutivo, diminuem em 25% o tempo de morte do hospedeiro e em 40% a alimentação do hospedeiro. O desenvolvimento de micoinseticidas alterados geneticamente oferece, claramente, uma alternativa aos pesticidas químicos.

A protease PR1 produzida por *M. anisopliae* promove uma melhoria no entendimento da entomopatogenicidade do fungo. A importância de PR1 durante o processo de infecção do fungo *M. anisopliae* foi sugerido, primeiramente, por possuir considerável habilidade para degradar cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1991). Segundo ST. LEGER *et al.*, (1986a), a protease PR1A é a única protease que degrada cutícula, e que é produzida em quantidades elevadas por todos os isolados patogênicos de *M. anisopliae*. A linhagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> de *M. anisopliae* é a mais patogênica para o carrapato *Boophilus microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000), quando comparada com as demais linhagens disponíveis no laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (Cbiot/UFRGS). Assim, construindo linhagens de *M. anisopliae* superexpressando a protease PR1A, que é envolvida no processo de infecção de hospedeiros do fungo, pode utilizá-las para o controle biológico de pragas. Evitando, com isso a utilização de inseticidas químicos, que são prejudiciais ao ambiente.

A eficiência de transformação para *M. anisopliae* obtida pelo método de biobalística para o plasmídeo pBT6 foi de 351 transformantes por  $\mu$ g de DNA. A estabilidade mitótica encontrada para os possíveis transformantes resistentes à benomil foi de 30%, quando co-transformado com o plasmídeo pAN52.1*Bam*HI*pr1A*. ST LEGER *et al.*, (1995) utilizaram o

método de biobalística para co-transformar *M. anisopliae* com um vetor que confere resistência ao benomil e um vetor que possui o gene GUS sob o controle de promotor constitutivo, e obtiveram uma frequência de transformação de 5 transformantes por  $\mu$ g de DNA e uma estabilidade mitótica de 50%. Comparando os dados de ST. LEGER *et al* (1995) com os dados deste trabalho obtivemos uma frequência de transformação superior, mas uma estabilidade mitótica inferior.

Para avaliar a produção da protease PR1A os transformantes em comparação com a linhagem selvagem foi medido o halo de degradação, produzido por cepas selvagens e transformantes em meio para detecção de proteases. Este meio contém leite em sua composição, fonte de caseína, que segundo ST. LEGER *et al.*, (1987a), é um substrato onde as proteases da família PR1 e PR2 do fungo *M. anisopliae* apresentam atividade máxima, com 100% de degradação. Foi testado o pH do meio de ácido a alcalino. Observou-se que o fungo alcalinizou o meio durante seu desenvolvimento. Para observar a mudança de coloração do meio foi utilizado o corante vermelho de bromocresol A partir dos experimentos, foi verificado que a maior atividade das proteases do fungo *M. anisopliae* selvagem se deu em pH 8,0. Estes resultados estão de acordo com ST. LEGER *et al.* (1999) que mostram que o fungo *M. anisopliae* altera o pH do ambiente permitindo a produção de proteases extracelulares e sua atividade, e com ST. LEGER *et al.*, (1987a) que determinou que o pH ótimo para a atividade das proteases da família PR1 é igual a 8,0.

Os resultados deste experimento mostraram que os transformantes T246bpr1A, T245bpr1A e T01bpr1A produzem halo no meio para proteases num tempo menor que a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>, assim apresentando diferença estatisticamente significativa em comparação à linhagem selvagem dos halos de degradação. A diminuição no tempo de degradação do meio para proteases ou o aumento da eficiência na degradação deste meio era esperado para os transformantes que tivessem o gene *pr1A* sendo expresso (ST. LEGER *et al.*, 1996a).

Para avaliar a atividade específica de proteases do tipo subtilisina aumentada nos transformantes em comparação à linhagem selvagem foi realizado ensaio enzimático específico com substrato peptídico sintético para protease do tipo subtilisina. Os possíveis transformantes devem apresentar expressão constitutiva da protease PR1A, proveniente da construção pAN52.1*Bam*HI*pr1A*, enquanto a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> deve apresentar expressão regulada por contato com o hospedeiro. O ensaio enzimático teve como resultado a

atividade de protease maior nos transformantes T246bpr1A, T245bpr1A e T01bpr1A em relação à linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>. Esse aumento foi de até 10 vezes quando as linhagens foram cultivadas em meio com glicose, que inibe a expressão da protease PR1A regulada do fungo, ou em meio indutor da sua expressão, com cutícula de carrapato. Através do teste de Tukey foi evidenciado que os transformantes T246bpr1A, T245bpr1A e T01bpr1A apresentam diferença significativa e maior que a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>. ST. LEGER *et al.*, (1996b) testaram a produção constitutiva da protease PR1A em linhagens transformantes de *M. anisopliae* em meio inibidor com N-acetilglicosamina e com meio indutor com cutícula de barata. Como resultado, obtiveram uma produção aumentada e significativa de até 17 vezes no meio inibidor e de até 2 vezes em meio indutor. Dessa forma, nossas linhagens transformantes do fungo superexpressando a protease PR1A, em média, foram mais eficientes que o descrito na literatura.

Com o mesmo sobrenadante, utilizado para o ensaio específico, foi feita uma análise em SDS-PAGE 12% para analisar a expressão da PR1A nas linhagens transformadas e na linhagem selvagem. Foi observado em todas as linhagens uma banda de proteína de massa molecular de aproximadamente 29 kDa. Esta é a massa molecular equivalente à proteína madura predita da protease PR1A, que segundo ST. LEGER *et al.*, (1992 a) é de 28,6kDa. As amostras foram analisadas a partir do mesmo volume do sobrenadante, foi observado que a linhagem transformada t245bpr1A expressa menor quantidade de proteínas totais em relação as demais. Apesar disso, por equivalência, podemos concluir que as três linhagens transformadas apresentaram maior expressão de proteína de 29 kDa quando comparadas com a linhagem selvagem. Podemos observar, também, que ocorreu um padrão diferenciado de expressão de diferentes proteínas de massa molecular estimada diferentes, entre as linhagens testadas, sendo que predominaram diferenças entre as linhagens transformadas e a selvagem. Essas diferenças podem ser devidas ao processo de transformação. Conforme FURLANETO *et al.* (1999), observaram secreção aumentada da quimoelastase (PR1) em algumas linhagens que foram transformadas com o plasmídeo pBT6 que confere resistência a benomil (gene  $\beta$ -tubulina).

Para analisar a co-transformação, se realizou uma PCR com *primers* específicos para o plasmídeo pAN52.1BamHI. A reação foi realizada com os transformantes que foram selecionados após as triagens de atividade de protease. As três linhagens transformadas t246bpr1A, t245bpr1A e t01bpr1A amplificaram um fragmento de DNA de tamanho esperado

ue é equivalente ao fragmento inserido no vetor, o gene *pr1A*, enquanto a linhagem selvagem não apresentou fragmento de amplificação. A partir da PCR foi realizada hibridização por *Southern*, no qual foi utilizado como sonda o fragmento de DNA contendo o gene *pr1A*, amplificado por PCR e purificado de gel de agarose. Foram observadas duas bandas na autoradiografia da hibridização, na qual apresentam tamanho de 1,5 Kb, esperado, e de 1,0 Kb. A banda de tamanho molecular menor apresentou maior intensidade. Ambas estavam presentes na auto-radiografia do resultado da amplificação do controle positivo, a construção pAN52.1BamHIpr1A. Existe uma probabilidade muito pequena de que esta banda possa ser fragmento de quebra da construção que também foi inserida na célula. Uma probabilidade maior é a de que seja o resultado de amplificação inespecífica. No total, foram analisados 40% dos transformantes obtidos no experimento de biobalística. Os transformados T246, T245 e T01 são transformantes superexpressando a protease PR1A, representando 12% dos transformados obtidos pelo método de biobalística, sendo a mesma eficiência obtida por ST. LEGER *et al.* (1995). Os transformados obtidos, que não foram analisados, serão também submetidos aos mesmos testes realizados com aqueles transformantes.

Para confirmar a inserção da transformação com o plasmídeo pAN52.1BamHIpr1A será realizado a técnica de hibridização por *Southern* com o DNA genômico dos transformantes T246, T245 e T01 comparando-se com a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>. Além disso, serão realizados os bioensaios em laboratório, para analisarmos a diferença de mortalidade dos carrapatos infectados pelos transformantes T246, T245 e T01 em comparação com a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>.

## 5 Conclusões

1- A frequência de transformação, utilizando a técnica de biobalística, foi de 351 transformantes por  $\mu$ g de DNA e a eficiência de co-transformação foi de 12%. A estabilidade mitótica dos transformantes foi de 30%.

2- A inserção da construção *pgpd::ORFpr1A::termtrpc* foi confirmada por PCR gerando um amplicom de 1,5Kb, utilizando *primers* específicos para o promotor *gpd* e o terminador *trpc*.

3- Os transformantes T246, T245 e T01 apresentam diferença significativa (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) em comparação a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub> para a atividade de protease, medida pela formação de halo de degradação em meio sólido com leite.

4- Nos ensaios cinéticos, utilizando substrato peptídico para subtilisinas, os transformantes analisados (T246, T245 e T01), apresentam diferença significativa (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) em meio indutor contendo cutícula do carrapato *Boophilus microplus* e em meio inibidor contendo glicose, em comparação a linhagem selvagem E<sub>6</sub>S<sub>1</sub>.

## 6 Referências

- ALVES, S.B., VIEIRA, S.A., SILVEIRA NETO, S. (1993) Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para ovos do carrapato *Boophilus microplus*. 14º Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba, p. 344.
- ALVES, S.B. (1998) Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. Editora Manole Ltda, Fealq, Piracicaba – SP, p.1163.
- ALVES-BRANCO, F.P.J., ECHEVARRIA, F.A.M. and SIQUEIRA, A.S. (1983) Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). **Comunicado Técnico** 1:1-4.
- AMIRI, B. (2000) Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. **Mycol. Res.** 104(4):447-52.
- ANDERSEN, S.O. (1974) Biochemistry of insect cuticle. **Ann. Rev. Entomology** 24:29-61.
- BARCI LAG. (1997) Biological control of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae) in Brazil) **Arq. Inst. Biol.** 64:95-101.
- BARRETO, C.C. (1996) Quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/UFRGS, RS.
- BERNIER, L., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K., CLARKSON, J.M. (1989) Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. **FEMS Microbiol. Let.** 60:261-266.
- BIDOCHKA, M. J., RAYMOND J. ST. LEGER., DONALD W. ROBERTS (1997). Mechanisms of Deteromycete Infections in Grasshoppers and Locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada** 171: 213-224.
- BIDOCHKA, M.J. & MELZER, M.J. (2000) Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B, and Pr1C) from *Metarhizium* strains. **Can. J. Microbiol.** 46(12):1138-44.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD, C.L., LIMA, A.F. (1994a) Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas de carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural Sér. Ciênc. Da Vida** 16:41-47.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD, C.L., LIMA, A.F. (1994b) Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural Sér. Ciênc. Da Vida** 16:49-55.
- BITTENCOURT, S.E.T. (1998) Purificação, caracterização parcial e localização de cobre zinco superóxido dismutase (CnZnSOD) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.
- BOGO, M. R., VAINSTEIN, M. H., ARAGÃO, F. J. L., RECH, E., SCHRANK, A. (1996a) High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Let.** 142:123-127.

- BOGO, M.R., QUEIROZ, M.V., SILVA, D.M., GIMÉNEZ, M.P., AZEVEDO, J.L., SCHRANK, A. (1996b) Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycol. Res.** 100(12):1468-72.
- BOGO, M.R., ROTA, C.A., PINTO, Jr.H., CAMPOS, M., CORREA, C.T., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. (1998) A chitinase encoding gene (*Chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. **Cur. Microbiol.** 37:1-6.
- BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-54.
- BROWN, R.S., REICHELDERFER, C.F., ANDERSON, W.R. (1970) An endemic disease among laboratory population, of *Dermacentor andersoni* (*D. venustus*) (Acarina: Ixodidae). **J. Invertebr. Pathol.** 16:142-43.
- BRUM, J.G.W. (1988) Infecção em teleógina de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al., 1981): etiopatogenia e sazonalidade. Rio de Janeiro - RJ. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.
- BURTON, M. & BURTON, B. (1969) Oxpecker. In *The International Wildlife Encyclopedia*, ed. M. Burton, B. Burton, pp. 1653-55. London, UK: BPC Publ.
- CASTRO, M.P. & PEREIRA, C. (1946) Alimentação das proteoninfas de *Boophilus* (*Urobooplius*) *microplus* Canestrini, 1887 (Ixodidae) com os restos necróticos da reação tissular do hospedeiro. **Arq. Inst. Bio. São Paulo.** 17:149-62.
- CHENGSHU WANG., MILTON A. TYPAS., TARIQ M. BUTT. (2002). Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters** 213 251-255
- CLARKSON, J.M. & CHARNLEY, A.K. (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol.** 4(5):197-203, 1996.
- CORDOVÉS, C.O. (1996) Carrapato: controle ou erradicação. Porto Alegre: 1ª ed Ed. Gralha.
- CORREIA, A.C.B., FIORIN, A.C., MONTEIRO, A.C., VERÍSSIMO, C.J. (1998) Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Stabled cattle. **J. Invertebr. Pathol.** 71:189-191.
- DRIVER, F., MILNER, R.J., TRUEMAN, J.W.H. (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol. Res.** 104:134-50. Cambridge University Press Copyright © The British Mycological Society 2000.
- EPA (Environmental Protection Agency) Food and Feed Additive Regulations and Exemption From the Requirement of a Pesticide Tolerance for the Microbial Pest Control Agent *Metarhizium anisopliae* strain ESF1. <http://pmep.cce.cornell.edu>. 2001..

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Roma - Itália <http://www.fao.org>. 1996.
- FARIAS, N.A.R., GONZALES, J.C. and SAIBRO, J.C. (1986) Antibiose e antixenose entre forrageiras e larvas de carrapato-de-boi. **Pesq. Agrop. Bras.** 21:1313-1320.
- FRAZZON, A.P.G., DA SILVA VAZ Jr., I., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2000) *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.** 93:117-25.
- FURLANETO, M. C., PAIÃO, F. G., PINTO, F. G.S., FUNGARO, M.H.P. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* to high resistance to benomyl. **Can. J. Microbiol.** 45: 875-878 (1999).
- GENBANK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- GOETTEL, M.S., ST. LEGER, R.J., BHAIRI, S., JUNG, M.K., OAKLEY, B.R., ROBERTS, D.W., STAPLES, R.C. (1990) Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. **Curr. Genet.** 17:129-132.
- GONZALES, J.C (1995) O controle do carrapato do boi. Porto Alegre, RS. 2<sup>a</sup> ed. Edição do Autor.
- GORSKOVA, G.J. (1966) Reduction of fecundity of Ixodidae ticks females by fungal infection. **Vetsn. Leningr. Univ. Ser. Biol.** 21:13-16.
- HORN, S. (1987) Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America. In: **World Veterinary Congress**, Proceedings 23 Montreal.
- HUXHAM, I. M., SAMUELS, K. D. L.; HEALE, J. B.; McCORKINDALE, N. J. (1989) *In vivo* and *in vitro* assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. **J. of Invert. Pathol.** 53: 143-151.
- IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) University of Bern – Switzerland <http://www.iubmb.unibe.ch/>
- JOSHI, L., ST. LEGER, R.J., ROBERTS, D.W. (1997) Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. **Gene** 197:1-8.
- JOSHI, L. & ST. LEGER, R.J. (1999) Cloning, expression, and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomathogen *Metarhizium anisopliae*. **J. Biol. Chem.** 274(14):9803-11.
- KAAYA, G.P., MWANGI, E.N. and OUNA, E.A. (1996) Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* **J. Invert. Pathol** 67:15-20.
- KALSBECK, V., FRANDBEN, F., STEENBERG, T. (1995) Entomopathogenic fungi associated with *Ixodes ricinus* ticks. **Exp. Appl. Acarol.** 19:45-51.

- KANG, S.C., PARK, S., LEE, D.G. (1998) Isolation and characterization of chitinases cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol.Lett.** 165(2):272-271.
- KUCERA, M. (1980) Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleri mellonella* larvae. **J. Invert. Pathol.** 35: 304-310.
- KUNZ, S.E. & KEMP, D.H. (1994) Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Revue Scientifique et Technique del Office International des Epizooties** 13 :1249-1286.
- LARANJA, R.J. (1979) O poder infestante da larva de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em diferentes condições e períodos de envelhecimento. Porto Alegre, 1979. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.
- LAVERLAM S.A. Cali Colombia. Fevereiro, 1999.  
[http://cali.cetcol.net.co/~laverlam/e\\_index.html](http://cali.cetcol.net.co/~laverlam/e_index.html)
- LONDT, J.G.H & WHITEHEAD, G.B. (1972) Ecological studies of larval ticks in South Africa. **Parasitol.** 65:469-490.
- LONDT, J.G.H. & ARTHUR, D.R. (1975) The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **J. Ent. Soc. Sth. Afr.** 38:321-340.
- LOPES, ROGÉRIO. BIAGGIONI., ALVES, SÉRGIO. BATISTA., TAMAI, MARCO. ANTONIO. Fungo *Metarhizium anisopliae* e o controle de *Frankliniella occidentalis* em alface Hidropônico. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.239-243, abr/jun. 2000.
- MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**, Jaguariúma, SP: EMBRAPA, 1998, v.1, 246p.
- MONTEIRO, A.C., FIORIN, A.C., CORREIA, A.C.B. (1998) Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (acari: ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia** 29:109-112.
- NAGAR, S.K. (1968) On the significance of the duration of preoviposition and ovoposition periods in ixodid tick. **Acarologia** 10:621-629.
- NEWTON, L.G. (1967) Life cycle of the cattle tick. **Qd. Agric. J.** 93: 222-225.
- NOLAN, J., WILSON, J.T., GREEN, P.E., BIRD, P.E. (1989) Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*) **Aust. Vet. J.** 66:179-182.
- OLIVEIRA, G.P., COSTA, R.P., MELLO, R.P., MENÉGUELLI, C.A. (1974) Estudo ecológico da fase não parasitária do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodidae) no Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Univ. Fed. Rural R. Janeiro** 4:1-10.
- PATERSON, I.C., CHARNLEY, K., COOPER, R.M., CLARKSON, J.M. (1994) Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metharhizium*

*anisopliae*. **Microbiol.** 140:185-189.0

- PINTO, A.S., BARRETO, C.C., SCHRANK, A., ULHOA, C.J.U., VAINSTEIN, M.H. (1996) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Can. J. Microbiol.** 43:322-327.
- PROTOCOLS AND APPLICATIONS GUIDE (1996) Third Edition. **Promega**. p. 45.
- PUNT, P.J., OLIVER, R.P., DINGEMANSE, M.A., POWWELS, P.H., VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. **Gene** 56:117-124.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. CSHL.
- SAMISH, M. & REHACEK, J. (1999) Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annu. Rev. Entomol.** 44:159-82.
- SCHRANK, A.; BASSANESI, M. C.; PINTO JR, H.; COSTA, S. V.; BOGO, M. R.; SILVA, M. S. N. (1993) Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metharhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura** 45:200-205.
- SCREEN, S., BAILEY, A., CHARNLEY, K., COOPER, R., CLARKSON, J. (1997) Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. **Curr. Genet.** 31(6):511-8.
- SCREEN, S.E. & ST. LEGER, R.J. (2000) Cloning, expression, and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Evidence for lateral gene transfer from an actinomycete bacterium. **J. Biol. Chem.** 275(9):6689-94.
- SHERLOCK, I.A. & GUITTON, N. (1982) Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sobre algumas espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Inst. Med. Trop.** 24:234-39.
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. (1986) Virulence of Mutants and Revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Toward *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebrat. Path.** 48:368-74.
- SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) <http://www.sindag.com.br>. 2001.
- SMITHSON, S.L., PATERSON, I.C., BAILEY, A.M., SCREEN, S.E., HUNT, B.A., COBB, B.D., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K., CLARKSON, J.M. (1995) Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene** 166:161-65.
- SOLOMON, K.R. (1983) Acaricide resistance in ticks. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.** 27:273-296.
- SONENSHIME, D.E. (1993) Biology of ticks. New York. Oxford University Press Inc.
- ST. LEGER, R.J., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K. (1986a) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **J. Gen. Microbiol.** 132:1509-17.

- ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R. M. (1986b) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **J. Invert. Pathol.** 48: 85-95.
- ST. LEGER, R.J., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K. (1987a) Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* e *Manduca sexta*, **J. Gen. Microbiol.** 133:1371-1382.
- ST. LEGER, R.J., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M. (1987b) Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Biochem. Biophys.** 253:221-232.
- ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. (1988a) Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **J. Invert. Pathol.** 52:285-293
- ST. LEGER, R.J., DURRANDAS, P.K., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K. (1988b) Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, **Arch. Microbiol.** 41501:413-416.
- ST. LEGER, R.J., BUTT, T.M., STAPLES, R.C., ROBERTS, D.W. (1989) Synthesis of Proteins Including a Cuticle-degrading Protease during Differentiation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experim. Mycol.** 13:253-62.
- ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** 136:1779-1789.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. (1991a) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 58:415-426.
- ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. (1991b) A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 57:299-310.
- ST. LEGER, R., FRANK, D.C., ROBERTS, D.W., STAPLES, R.C. (1992a) Molecular cloning and regulatory analysis the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metharhizium anisopliae*. **J. Biochem.** 204:991-1001.
- ST. LEGER, R.J., STAPLES, R.C., ROBERTS, D.W. (1992b) Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene** 120:119-24.
- ST. LEGER, R.J., FRANK, D.C., ROBERTS, D.W., STAPLES, R.C. (1993) Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Eur. J. Biochem.** 204:991-1001.
- ST. LEGER, R.J., BIDOCHKA, M.J., ROBERTS, D.W. (1994) Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Bioch. Bioph.** 313(1):1-7.
- ST. LEGER, R.J., SHIMIZU, S., JOSHI, L., BIDOCHKA, M.J., ROBERTS, D.W. (1995) Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. **FEMS Microbiol. Lett.** 131:289-94.

- ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M.J., ROBERTS, D.W. (1996a) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93:6349-6354.
- ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M.J., RIZZO, N.W., ROBERTS, D.W. (1996b) Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **App. Environm. Microbiol.** 62:1257-1264.
- ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., ROBERTS, D. (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64 :709-13.
- ST. LEGER, R.J., NELSON, J.O., SCREEN, S.E. (1999) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiol.** 145:2691-99.
- STRINGER, M.A., DEAN, R.A., SEWALL, T.C., TIMBERLAKE, W.E. (1992) *Rodletless*, a new *Aspergillus* developmental mutant induced gene inactivation. **Gene Dev.** 5:1161-71.
- SUTHERST, R.W., JONES, R.J., SCHNITZERLING, H.J. (1982) Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature** 295: 320-321.
- TABOR, S. & RICHARDSON, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Biotechnol.** 62(1):60-65.
- TANADA, Y. & KAYA, H.K. (1993) **Ins. Pathol.** San Diego: Academic. 666 pp.
- TULLOCH, H. (1976) The Genus *Metarhizium anisopliae*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 66 :407-11.
- VIEIRA, J. & MESSING, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp17-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene** 19:259-68.
- WAGLAND, B.M. (1978) Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. **Aust. J. Agri. Res.** 29:401-409.
- YOUNG, A.S. & MORZARIA, S.P. (1986) Biology of *Babesia*. **Parasitol. Today** 2:211-219.
- ZHIOA, E., BROWING, M., JONHSON, P.W., GINSESBERG, H.S., LEBRUM, R.A. (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularum* (Acari:ixodidae). **J. Parasitol.** 83 (5): 815-818.