

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

***METARHIZIUM ANISOPLIAE*: ESTUDO FUNCIONAL DO GENE *emp1* E
ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE QUITINASES EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

Dissertação de Mestrado

BÁRBARA KUNZLER SOUZA

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

***METARHIZIUM ANISOPLIAE*: ESTUDO FUNCIONAL DO GENE *emp1* E
ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE QUITINASES EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

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

BÁRBARA KUNZLER SOUZA

DR. AUGUSTO SCHRANK, orientador

DR. CHARLEY CHRYSTIAN STAATS, co-orientador

Porto Alegre, de 2011

Este trabalho foi desenvolvido no LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE FUNGOS FILAMENTOSOS, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília

Dr. Clayton Luiz Borges

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/ICB
Universidade Federal de Goiás

Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica
Centro de Biotecnologia da UFRGS

Dra. Irene Silveira Schrank

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

DEDICATÓRIA

AO DIEGO E À MINHA FAMÍLIA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente:

Ao meu orientador Dr. Augusto Schrank, pelas oportunidades e pela confiança depositadas em minha capacidade e no meu trabalho, pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal;

À Dra. Marilene Henning Vainstein pelas oportunidades de estágio de iniciação científica, aprendizados e pela confiança;

À relatora da dissertação, Dra. Irene Silveira Schrank pelas sugestões e ensinamentos;

À comissão de acompanhamento composta pelo Dr. Charley Christian Staats e pela Dra. Márcia Furlaneto pela supervisão durante a execução do projeto;

À Dra Livia Kmetzsch pelas valiosas sugestões e ensinamentos durante a elaboração da redação científica;

Ao Dr. Juliano Tomazzoni Boldo e ao Dr. Charley Christian Staats pelos seus valiosos ensinamentos e apoio durante essa trajetória;

À Irina Lübeck e Lis Ribeiro pelos ensinamentos, amizade, incentivo e pelo carinho durante minha iniciação científica;

Aos colegas dos laboratórios 217, 220, 222 pela amizade e apoio;

Aos meus colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Juliana Beringer, Ângela, Juliano, Livia, Charley e Broetto;

Em especial aos meus colegas e amigos que tornaram meus dias de trabalho muito mais felizes e divertidos: Juliana Beringer, Ângela, Virgínia, Juli, Caru, Lívia, Luciana, Mel, Elisa, Vanessa, Vanessa F., Lucélia, Juliano, Charley, Broetto e Walter.

À Juliana Beringer pela amizade incondicional, por me apoiar em todos os momentos, pelos conselhos, pelos momentos de alegria, pelo companheirismo e por ser uma grande amiga.

Aos meus pais, Zuleica e Antônio, por todo apoio, incentivo, ensinamentos, amor incondicional dados por vocês durante toda minha vida que contribuiu muito para que eu realizasse essa etapa de minha vida; Amo vocês!

À minha irmã e amiga, Carine, pelo amor incondicional, pela ajuda intelectual e emocional, pelo incentivo e conselhos, por estar sempre ao meu lado e me apoiar em todos os momentos da minha vida. Te amo!

Ao meu noivo, Diego, pelo amor incondicional, paciência, compreensão, pelo apoio emocional e incentivo. Obrigada por estar ao meu lado durante essa fase mais importante da minha vida. Te amo!

Aos técnicos Sr. Milton e Sr. Paulo pela ajuda constante e paciência;

Aos secretários Sílvia e Luciano pela ajuda e por serem muito competentes em seu trabalho;

A rede PIGS no Cbiot – UFRGS pelos sequenciamentos realizados;

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	5
1.2. CONTROLE BIOLÓGICO POR FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS	9
1.3. MECANISMO DE PATOGÊNESE POR <i>M. ANISOPLIAE</i>	12
1.3.1. Interações patógeno-hospedeiro	12
1.3.2. Fatores que determinam virulência a <i>M. anisopliae</i>	14
1.3.2.1. Estágio de adesão.....	18
1.3.2.2. Estágio de penetração.....	19
1.3.2.3. Estágio de colonização.....	20
1.3.2.4. Estágio de extrusão de hifas e conidiação	23
2. OBJETIVOS	27
3. CAPÍTULO 1	29
3.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1.1. Comparação entre fungos fitopatógenos e entomopatógenos	29
3.1.2. Apressório em fungos fitopatógenos	31
3.1.2.1. Diferenciação e fisiologia do apressório	31
3.1.2.2. Ciclo celular relacionado à formação do apressório	35
3.1.2.3. Vias de transdução de sinal associadas à diferenciação do apressório.....	37
3.1.3. Apressório em fungos entomopatógenos	44
3.1.4. Proteínas de matriz extracelular âncoradas por GPI	46
3.2. OBJETIVO	50

3.3. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.3.1. Material biológico.....	50
3.3.1.1. Linhagem de <i>Metarhizium anisopliae</i>	50
3.3.1.2. Linhagem de <i>Escherichia coli</i>	50
3.3.1.3. Linhagem de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
3.3.2. Meios de cultivo	51
3.3.2.1. Manutenção e manipulação de <i>M. anisopliae</i>	51
3.3.2.2. Manutenção e manipulação de <i>E. coli</i>	51
3.3.3. Manipulação de ácidos nucleicos	51
3.3.4. Soluções e enzimas utilizadas.....	52
3.3.5. Otimização da indução <i>in vitro</i> de apressório e blastosporos.....	52
3.3.5.1. Condições experimentais <i>in vitro</i> para indução de apressório	52
3.3.5.2. Condições experimentais <i>in vitro</i> para indução de blastosporos...	53
3.3.6. Preparação e armazenamento dos tipos celulares de <i>M. anisopliae</i>	53
3.3.7. Extração de RNA total e síntese de cDNA	54
3.3.8. Análise transcricional do gene <i>emp1</i> de <i>M. anisopliae</i>	54
3.3.9. Construção do cassete de inativação para o gene <i>emp1</i> de <i>M. anisopliae</i>	54
3.3.10. Transformação Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
3.3.11. Seleção de transformantes com inserção do cassete de inativação para o gene <i>emp1</i>	58
3.4. RESULTADOS.....	60
3.4.1. Otimização de condições experimentais <i>in vitro</i> para a indução de diferentes tipos celulares produzidos por <i>M. anisopliae</i>	60
3.4.1.1. Indução <i>in vitro</i> de apressório	60
3.4.1.2. Indução <i>in vitro</i> de blastosporos.....	62
3.4.2. Avaliação da integridade do RNA total e síntese de cDNA	64
3.4.3. Análise transcricional do gene <i>emp1</i> em diferentes condições de diferenciação celular de <i>M. anisopliae</i>	65
3.4.4. Isolamento das regiões flangeadoras 5' e 3' do gene <i>emp1</i>	66
3.4.5. Confirmação da montagem do cassete pPZP:: <i>bar: emp1</i>	67

3.4.6. Seleção de possíveis transformantes de <i>M. anisopliae</i> inativados para o gene <i>emp1</i>	67
3.5. DISCUSSÃO	72
3.6. PERSPECTIVAS.....	78
4. CAPÍTULO 2	79
4.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	79
4.1.1. Quitinases em Fungos.....	79
4.1.2. Quitinases de <i>M. anisopliae</i>	87
4.2. OBJETIVO	90
4.3. MATERIAL E MÉTODOS	90
4.3.1. Indução <i>in vitro</i> de apressório e blastosporos	90
4.3.2. Preparação das amostras, extração de RNA total e síntese de cDNA	90
4.3.3. Detecção de transcritos de quitinases por RT-PCR	90
4.4. RESULTADOS.....	93
4.4.1. Análise transcricional de quitinases em diferentes tipos celulares produzidos por <i>M. anisopliae</i>	93
4.5. DISCUSSÃO	100
4.6. PERSPECTIVAS.....	107
5. CONCLUSÕES	108
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

ANEXOS

ANEXO 1 – INTEGRIDADE DO RNA TOTAL ORIUNDO DE DIFERENTES TIPOS CELULARES DE <i>M. ANISOPLIAE</i>	132
ANEXO 2 – REAÇÃO DE CONTROLE NEGATIVO DE RNAs TOTAL ORIUNDOS DE DIFERENTES TIPOS CELULARES DE <i>M. ANISOPLIAE</i>	132
ANEXO 3 – CURRÍCULO LATTES	133

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcento
°C	graus Celcius
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
ATMT	Agrotransformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BD	Borda Direita do Vetor pPZP201BK
BE	Borda Esquerda do Vetor pPZP201BK
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzymes Database</i>
CBD	<i>Cellulose Binding Domain</i> (Domínio de ligação à celulose)
cDNA	DNA complementar
ChBD	<i>Chitin Binding Domain</i> (Domínio de ligação à quitina)
C-terminal	Carboxi-terminal
DEPC	Dimetilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> (etiquetas de sequências expressas)
g	grama ou força gravitacional
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glicosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IM	Meio de indução
IPTG	Isopropiltiogalato
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Dalton
LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
m/v	Massa por volume
MC	Meio de cove
MCC	Meio de cove completo

MÊS	Ácido 2-(<i>N</i> -Morfolino)etanosulfônico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	minuto
mL	mililitro
MM	Meio mínimo
mM	milimolar
MPa	mili Pascal
mRNA	RNA mensageiro
MS/MS	Espectrometria de massas com análise em tandem
Ng	nanogramas
N-terminal	Amino-terminal
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (fase aberta de leitura)
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial de hidrogênio
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase em tempo real)
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa)
s	segundos
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo Selvagem)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>METARHIZIUM</i>	8
TABELA 2 – ESPÉCIES DE ARTRÓPODES HOSPEDEIROS DE <i>M. ANISOPLIAE</i>	11
TABELA 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DO CASSETE PPZP:: <i>BAR</i> :: <i>EMP1</i> , NA SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES E NA ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE <i>EMP1</i>	55
TABELA 4 – CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR UTILIZADAS PARA AS DETECTAR TRANSCRITOS DE QUITINASES.	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> LINHAGEM E6..	6
FIGURA 2 – ESTÁGIOS DO PROCESSO DE INFECÇÃO DO ENTOMOPATÓGENO <i>M. ANISOPLIAE</i>	26
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE O ASPECTO MORFOLÓGICO DE APRESSÓRIOS DO FUNGO FITOPATÓGENO <i>M. GRISEA</i> E DO ENTOMOPATÓGENO <i>M. ANISOPLIAE</i>	30
FIGURA 4 – VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NECESSÁRIAS PARA O DESENVOLVIMENTO MORFOGENÉTICO RELACIONADO À PATOGENIA DE <i>M. ORYZAE</i> .	43
FIGURA 5 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DA PROTEÍNA PREDITA EMP1 DE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	49
FIGURA 6 – SEQUÊNCIA DAS REGIÕES 5’ E 3’ FLANQUEADORAS DO GENE <i>EMP1</i> UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INATIVAÇÃO PPZP:: <i>BAR</i> :: <i>EMP1</i>	56
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INATIVAÇÃO DO GENE <i>EMP1</i>	57
FIGURA 8 – INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE APRESSÓRIO POR <i>M. ANISOPLIAE</i>	61
FIGURA 9 – INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ESTÁGIOS INICIAIS DE CRESCIMENTO VEGETATIVO ATÉ A FORMAÇÃO DE BLASTOSPOROS.	63
FIGURA 10 – REAÇÃO DE CONTROLE POSITIVO DE cDNAs ORIUNDOS DE DIFERENTES TIPOS CELULARES DE <i>M. ANISOPLIAE</i>	64
FIGURA 11 – PERFIL TRANSCRICIONAL DO GENE <i>EMP1</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE <i>M. ANISOPLIAE</i>	65
FIGURA 12 – AMPLICONS GERADOS A PARTIR DAS REGIÕES FLANQUEADORAS 5’ E 3’ DO GENE <i>EMP1</i> DE <i>M. ANISOPLIAE</i>	66
FIGURA 13 – CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO CASSETE PPZP:: <i>BAR</i> :: <i>EMP1</i>	67
FIGURA 14 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS TRANSFORMANTES DE <i>M. ANISOPLIAE</i> CONTENDO O CASSETE DE INATIVAÇÃO PPZP:: <i>BAR</i> :: <i>EMP1</i>	69
FIGURA 15 – SELEÇÃO DOS POSSÍVEIS TRANSFORMANTES DE <i>M. ANISOPLIAE</i> INATIVADOS PARA O GENE <i>EMP1</i> POR PCR.....	70
FIGURA 16 – CONFIRMAÇÃO DOS POSSÍVEIS TRANSFORMANTES DE <i>M. ANISOPLIAE</i> INATIVADOS PARA O GENE <i>EMP1</i> ..	71

FIGURA 17 – CONFIRMAÇÃO DA MARCA DE RESISTÊNCIA A GLIFOSINATO DE AMÔNIO (GENE <i>BAR</i>) DOS TRANSFORMANTES.....	71
FIGURA 18 – ESTRUTURA DE DOMÍNIOS E ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE QUITINASES DO SUBGRUPO A EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE <i>M. ANISOPLIAE</i>.....	96
FIGURA 19 – ESTRUTURA DE DOMÍNIOS E ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE QUITINASES DO SUBGRUPO B EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE <i>M. ANISOPLIAE</i>.....	97
FIGURA 20 – ESTRUTURA DE DOMÍNIOS E ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE QUITINASES DO SUBGRUPO C EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE <i>M. ANISOPLIAE</i>.....	98
FIGURA 21 – ESTRUTURA DE DOMÍNIOS E ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE QUITINASES DO SUBGRUPO D EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE <i>M. ANISOPLIAE</i>.....	99

RESUMO

Para infectar seus hospedeiros artrópodes, *Metarhizium anisopliae* produz uma série de enzimas hidrolíticas e diversas alterações morfológicas como a formação de estruturas denominadas de apressórios e blastosporos. Estas estruturas de infecção representam estágios cruciais de penetração e disseminação no inseto hospedeiro, respectivamente. Além disso, o apressório é uma estrutura conservada entre fungos entomopatogênicos e fitopatogênicos. O gene *emp1* (codifica uma proteína de matriz extracelular de *Magnaporthe grisea*) parece ter um papel importante na diferenciação do apressório, bem como na patogenicidade e virulência. Um dos nossos objetivos foi avaliar a possível função de um ortólogo do gene *emp1* em *M. anisopliae* pela análise do perfil transcricional e construção de mutantes funcionais por mutagênese insercional utilizando agrotransformação. Foram geradas linhagens transformantes contendo o cassete de inativação do gene *emp1* (pPZP::*bar*::*emp1*), sendo este construído pela subclonagem das regiões flangeadoras 5' (1.515pb) e 3' (1.513pb), fusionadas a um cassete de expressão do gene *bar* (3.500pb) que confere resistência a glifosinato de amônia. A frequência de transformação observada nesta etapa de transformação foi superior a 60%, porém em apenas 1,5% dos transformantes há indícios de recombinação homóloga. Também foi analisado o perfil transcricional de *emp1*, sob três condições anteriormente padronizadas: células diferenciadas em apressório, hifas (crescimento vegetativo), e blastosporos, sendo observada a presença de transcritos deste gene em todas as condições testadas. Em uma segunda etapa deste trabalho, foi avaliado o perfil transcricional de quitinases putativas de *M. anisopliae* nos estágios de diferenciação celular de apressório, hifas e blastosporos. Esta classe de proteínas está diretamente envolvida no remodelamento da parede celular fúngica durante a diferenciação celular, como também na degradação da quitina da cutícula do hospedeiro durante a etapa de penetração. Originalmente foram caracterizados três genes para quitinases (*chit1*, *chi2* e *chi3*), e a análise *in silico* do genoma revelou outras 20 quitinases putativas de *Metarhizium*. Essa diversidade pode ser responsável pelas diferentes funções que o conjunto de enzimas quitinolíticas tem na degradação de quitina durante o ciclo de vida e de infecção do fungo. É,

portanto importante: (i) validar transcricionalmente as quitinases putativas e (ii) tentar atribuir função a cada uma delas. Para isso, procedemos a análise dos transcritos de cada uma das 23 quitinases putativas sendo sintetizados cDNAs a partir das três condições de diferenciação celular (apressório, hifas e blastosporos). Na condição de diferenciação a apressório dez espécies de transcritos foram detectadas sendo seis do subgrupo A, três do subgrupo B, uma do subgrupo D. Nenhum transcrito de quitinases do subgrupo C foi detectado nas condições testadas. Tanto em crescimento vegetativo quanto em blastosporos foram detectadas sete espécies de transcritos de quitinases do subgrupo A, e uma do subgrupo D. As quitinases do subgrupo B diferiram quanto a sua distribuição nas condições testadas: três espécies de transcritos foram detectadas durante o crescimento vegetativo e seis em blastosporos. O estudo envolvendo os diferentes genes putativos (*emp1* e de quitinases) de *M. anisopliae*, sob as diversas abordagens, representa um importante precursor para nos fornecer indicativos sobre as funções destes genes no ciclo de vida e de infecção de *Metarhizium*.

ABSTRACT

To infect their arthropod hosts, *Metarhizium anisopliae* produces a series of hydrolytic enzymes and several morphological changes, including the formation of structures called appressoria and blastospores. These infective structures represent crucial stages of penetration and dissemination in the insect host, respectively. In addition, the appressorium is a structure conserved among phytopathogenic and entomopathogenic fungi. The *emp1* gene (encodes an extracellular matrix protein) from *Magnaporthe grisea* showed an important role in appressorium differentiation, as well as pathogenicity and virulence. Our goal was to evaluate the possible role of an ortholog gene *emp1* in *M. anisopliae* by transcriptional analysis and construction of functional mutants by insertional mutagenesis mediated by agrotransformation. We generated transformant strains containing the gene inactivation cassette of *emp1* (pPZP::*bar*::*emp1*), which was constructed by subcloning of flanking portions 5' (1.515bp) and 3' (1.513bp) fused in an expression cassette of *bar* gene (resistance to glufosinate ammonium). The frequency of transformation observed in this round was higher than 60%, but only 1.5% of the transformants show evidence of homologous recombination. We also analysed the transcriptional profile of *emp1* under three conditions previously standardized, such as differentiated cells in appressorium, hyphae (vegetative growth) and blastospores. Accordingly, we observed the presence of transcripts of this gene in all growth conditions tested. In a second step of this work, we evaluated the transcriptional profile of putative chitinases of the *M. anisopliae* in those different stages of cellular differentiation. This class of proteins is directly involved in fungal cell wall remodeling during cellular differentiation, as well as degradation of chitin in the host cuticle during the penetration stage. Originally we characterized three genes of chitinases (*chit1*, *chit2* and *chit3*), but apart from these, the *in silico* analysis of the genome revealed 20 putative chitinases. This diversity may be responsible for different functions that the set of chitinase enzymes have in the chitin degradation during the life and infection cycle of the fungus. It is therefore important: (i) validate transcriptionally the putative chitinases and (ii) attempting to assign function to each one of them. Chitinase transcript survey was performed using cDNAs from three cell types: appressorium,

vegetative growth and blastospores. In the appressorium condition ten species of transcripts were detected being six from the subgroup A chitinases, three from group B and one from group D. No transcripts of subgroup C chitinases were detected. Both in vegetative growth and blastospores seven species of transcripts of the subgroup A, and one from group D were detected. Chitinases from subgroup B differed - three species of transcripts were detected during vegetative growth and six were detected in blastospores. This study of several putative genes (as *emp1* and chitinases) of *M. anisopliae*, under different approaches, may represent an important preliminary outcome to shed a light in the functions of these genes during life cycle and infection of *Metarhizium*.

1. INTRODUÇÃO

Metarhizium anisopliae é um entomopatógeno bem caracterizado que é considerado modelo para o estudo de interações patógeno-hospedeiro devido ao seu amplo potencial como agente biocontrolador de diversos artrópodes hospedeiros (St Leger, 2008, Dutra *et al.*, 2004). Por esta razão, muitos esforços estão voltados à elucidação da biologia deste entomopatógeno pela sua grande importância no controle de pragas na agricultura (Sosa-Gómez & Moscardi, 1998, Almeida *et al.*, 2003), na pecuária (Zhioua *et al.*, 1997, Frazzon *et al.*, 2000) e de vetores de doenças humanas (Lacey *et al.*, 1988, Luz *et al.*, 1998, Thomas & Read, 2007, Scholte *et al.*, 2005, Kaaya & Munyinyi, 1995).

A utilização de fungos entomopatogênicos ainda possui um revés que é o tempo necessário para matar seus hospedeiros, sendo este maior em comparação aos pesticidas químicos. No entanto, a eficiência do biocontrole pode ser aumentada com a utilização de linhagens com maior grau de especificidade e potencial de virulência (Lübeck *et al.*, 2008) e também pela construção de linhagens melhoradas através da superexpressão de genes (determinantes de patogenicidade) ou de proteínas tóxicas inseticidas, dessa maneira reduzindo o tempo necessário para a eliminação dos insetos-praga (Hu & St Leger, 2002, Lu *et al.*, 2008, St Leger, 2007, St Leger *et al.*, 1996b, Pava-Ripoll *et al.*, 2008, Wang & St Leger, 2007c, Screen *et al.*, 2001). Além destas, outras características como a persistência e estabilidade do esporo no ambiente e a redução da carga de inóculo necessária para aplicação, são importantes no que diz respeito a uma formulação comercialmente viável e eficiente.

A interação entre *M. anisopliae* e seus hospedeiros é um processo multifatorial (Kershaw *et al.*, 1999, Roberts & St. Leger, 2004, St Leger *et al.*, 1996b, Da Silva *et al.*, 2005, Dutra *et al.*, 2004). Por isso, diversas abordagens em nível genético, celular e bioquímico têm sido utilizadas para melhor entender este complexo processo biológico. Essas abordagens visam principalmente esclarecer as funções de genes através da construção de mutantes nulos, como também por análises do perfil de expressão global de mRNA, proteínas e metabólitos em condições de infecção permitindo caracterizar fatores-chave da infecção de artrópodes por *Metarhizium*.

Sabe-se que o processo de infecção por fungos entomopatógenos é iniciado pela adesão de conídios na superfície do hospedeiro através de interações hidrofóbicas (Bidochka *et al.*, 2001, Wessels, 1996, St Leger *et al.*, 1992). Esta etapa também envolve a combinação de diferentes aspectos: i) degradação da cutícula por enzimas hidrolíticas; ii) diferenciação em estruturas especializadas como o apressório, estrutura formada na extremidade distal do tubo germinativo que exerce pressão mecânica sob a cutícula do hospedeiro, caracterizando o processo de pré-penetração (Arruda *et al.*, 2005, St Leger *et al.*, 1991b); e iii) diferenciação em blastosporos, estruturas unicelulares arredondadas que facilitam a disseminação do fungo na hemolinfa do hospedeiro, caracterizando a pós-penetração (Thomas & Read, 2007). Os estágios de penetração (transposição da cutícula do hospedeiro) e disseminação (superação do sistema imune hospedeiro) são cruciais para que o fungo estabeleça infecção em seus hospedeiros (Clarkson & Charnley, 1996, Zhang & Xia, 2009, Dutra *et al.*, 2004).

A formação do apressório é uma estratégia bastante conservada entre fungos entomopatogênicos e fitopatogênicos para infectar seus hospedeiros (Dean, 1997). Em fungos fitopatogênicos, alguns genes que codificam proteínas do ciclo celular, de vias de transdução de sinal, de matriz extracelular têm sido descritos, e relacionados ao apressório (Wilson & Talbot, 2009, Caracuel-Rios & Talbot, 2007, Ahn *et al.*, 2004). No que diz respeito à proteínas de matriz extracelular, o gene *emp1* de *Magnaporthe grisea* apresentou provável participação na diferenciação do apressório, e consequentemente na patogenicidade e virulência. Linhagens mutantes $\Delta emp1$ de *M. grisea* apresentaram redução nos níveis de formação do apressório e de patogenicidade, no entanto, não afetando a taxa de crescimento micelial e esporulação (Ahn *et al.*, 2004). Esses autores mostraram ainda que provavelmente exista um ortólogo do gene *emp1* em *M. anisopliae*. Posterior a este estudo, nosso grupo isolou e caracterizou uma ORF de 678pb correspondendo a uma proteína putativa de 266 aminoácidos, que provavelmente corresponde ao gene *emp1* de *M. anisopliae* (Carvalho, 2009). E de acordo com análises *in silico*, esta proteína apresentou características típicas de proteínas de matriz extracelular ancoradas por GPI.

Com o intuito de avaliar a possível função deste ortólogo do gene *emp1* em *M. anisopliae*, nosso objetivo na primeira etapa deste trabalho é analisar o perfil transcricional deste gene e construir mutantes funcionais por mutagênese insercional utilizando agrotransformação (Staats *et al.*, 2007).

Em uma segunda etapa deste trabalho, iremos avaliar o perfil transcricional de quitinases putativas de *M. anisopliae* em diferentes tipos celulares incluindo apressório, hifas, blastosporos. As quitinases estão diretamente envolvidas no remodelamento da parede celular fúngica durante a diferenciação celular, e como também na degradação da quitina da cutícula do hospedeiro durante a etapa de penetração. Entretanto, o envolvimento desta classe de proteínas na formação de estruturas especializadas produzidas por *M. anisopliae* (apressório e blastosporos) ainda é pouco conhecido.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a expressão de enzimas hidrolíticas como quitinases é induzida em substratos complexos como a quitina, e reprimida em fontes de carbono de fácil assimilação (Barreto *et al.*, 2004, Krieger de Moraes *et al.*, 2003, De la Paz Gimenez-Pecchi *et al.*, 2002). Ainda, caracterizamos três genes que codificam quitinases (*chit1*, *chi2* e *chi3*). Inicialmente isolamos e caracterizamos o gene *chi3*, e purificamos esta quitinase que possui a massa molecular de 30 KDa (CHIT30) e apresenta atividade de endo e exoquitinase (Da Silva *et al.*, 2005). Outro gene de quitinase, *chit1* foi clonado (Bogo *et al.*, 1998) e através de expressão heteróloga em *Escherichia coli* foi demonstrado que a proteína codificada por este gene possui a massa molecular de 42KDa e apresenta atividade de endoquitinase (Baratto *et al.*, 2003). E o terceiro gene de quitinase, *chi2* foi clonado e caracterizado (Baratto *et al.*, 2006), e recentemente Boldo *et al.* (2009) demonstraram que linhagens superexpressando *chi2* foram mais virulentas em comparação ao tipo selvagem frente ao hospedeiro, e opostamente, mutantes inativados para este gene demonstraram virulência reduzida, o que comprova a função desta quitinase no processo de infecção.

Além disso, uma grande variedade de quitinases putativas de fungos tem sido identificada devido ao aumento de projetos de sequenciamento de genomas de diversos fungos nos últimos anos. De acordo com banco de dados de

genomas sequenciados (NCBI; BROAD Institute), fungos filamentosos tipicamente podem conter uma média entre 10 e 25 quitinases diferentes (Seidl, 2008). Um exemplo é o micopatógeno *Trichoderma reesei* que apresenta 18 quitinases putativas em seu genoma. Através de biomineração em escala genômica, nosso grupo identificou 20 quitinases putativas no genoma de *Metarhizium*, salvo três genes de quitinases (Chit1, Chi2 e Chi3) experimentalmente já comprovados (Bogo et al., 1998, Da Silva et al., 2005, Baratto et al., 2006). As quitinases de *M. anisopliae* foram caracterizadas e categorizadas nos subgrupos A, B, C e subgrupo D, a partir de análises *in silico* realizadas por Junges (2010). Apesar da grande quantidade de dados *in silico* já minerados tanto sobre as quitinases como sobre o gene *emp1*, muitos estudos ainda são necessários para elucidar as diferentes funções que estes genes possivelmente têm no ciclo de vida e de infecção de *Metarhizium*.

1.1. Características gerais de *Metarhizium anisopliae*

Inicialmente descrito como *Entomophthora anisopliae* por Metschnikoff (1879) (Alves, 1998, Charnley, 1991), o ascomiceto *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales:Clavicipitaceae) possui um amplo espectro de hospedeiros podendo infectar mais de 300 espécies de artrópodes, incluindo desde ácaros até insetos (Roberts & St. Leger, 2004). Devido a esta característica, este entomopatógeno passou a ser considerado um modelo biológico para o estudo de interação patógeno – hospedeiro e como também amplamente utilizado no controle de pragas.

A taxonomia do gênero foi revista inicialmente por (Tulloch, 1976), que reconheceu apenas duas espécies: *M. anisopliae* (Metsch.)Sorok.1883 e *M. flavoviride* (Gams, Rozsypal). Posteriormente, de acordo com critérios morfológicos, são reconhecidas três espécies para o gênero *Metarhizium*: *M. anisopliae*, (Metsch.) Sorok. 1883, *M. flavoviride* (Gams, Rozsypal) e *M. album* (Petch), subdivididas em nove variedades (Driver *et al.*, 2000). Posterior a esse estudo, com bases em análises moleculares, o gênero *Metacordyceps* é proposto para três espécies de *Cordyceps* (espécies teleomórficas de *Metarhizium*) que inclui *C. brittlebankisoides* (Yi Liu *et al.*, 2001), *C. campsosterni* (Zhang *et al.*, 2004) e *C. taii* (Liang *et al.*, 1991), entre os membros do clado Clavicipitaceae, sendo o mais conhecido deles, o gênero anamórfico *Metarhizium*, devido a sua importância no controle biológico (Sung *et al.*, 2007). Entretanto, recentemente (Bischoff *et al.*, 2009) propuseram uma nova classificação do Complexo *Metarhizium anisopliae*, elevando o reconhecimento de variedades para o nível de espécie no gênero *Metarhizium*, que compreende em onze espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. brunneum*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. globosum*, *M. robertsii*, *M. flavoviride* e *M. frigidum* (Tabela 1).

Morfologicamente, *M. anisopliae*, apresenta-se como um fungo filamentososo com micélio hialino e septado, com conidióforos dos quais emergem conídios (normalmente uninucleados e cilíndricos) organizados em colunas (Figura 1). As formas conhecidas de reprodução compreendem a assexual, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo, e a parasexual, caracterizada por fenômenos

como a heterocariose e a recombinação somática (Roberts & St. Leger, 2004, Arruda *et al.*, 2005). O desenvolvimento vegetativo para o fungo *M. anisopliae* ocorre geralmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura e pH ótimos entre 24 e 30°C e 6,9, respectivamente, apesar da tolerância a um intervalo de pH relativamente alto (2,0 a 8,5) (Arruda *et al.*, 2005).

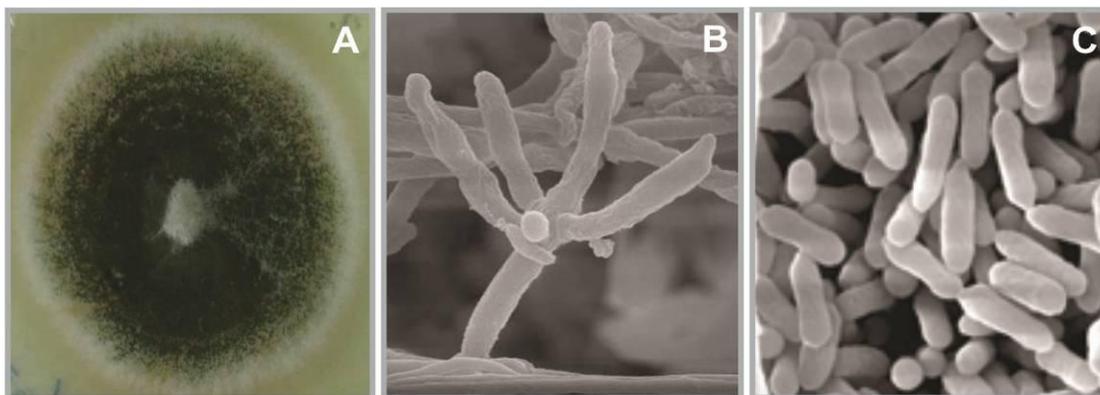


Figura 1 - Características morfológicas de *Metarhizium anisopliae* linhagem E6. Colônia de *M. anisopliae* (A), Conidióforos (B), e conídios cilíndricos (C). A colônia foi fotografada em Meio MCc após 21 dias de cultivo a 28 °C. Em destaque foto-micrografias e Microscopia Eletrônica de varredura de conidióforo e de esporos. Linhagem E6. (Imagem modificada de Arruda *et al.* 2005) .

M. anisopliae é adaptado à vida na rizosfera (Hu & St Leger, 2002), e apresenta distribuição cosmopolita (Roberts & St. Leger, 2004) incluindo todas as regiões terrestres, exceto Antártica (Sung *et al.*, 2007). Este é conhecido como causador da doença em insetos, chamada *Green muscarine*, pela coloração verde dos conídios em cadáveres mumificados (Roberts & St. Leger, 2004, Freimoser *et al.*, 2005, Kanzok & Jacobs-Lorena, 2006). Sendo que alguns dos hospedeiros de *M. anisopliae* são pragas da agricultura, como: a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha-das-pastagens (*Deois sp* e *Zulia sp*), a lagartada-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), a formiga saúva (*Atta sexdens*), os térmitas subterrâneos (*Isoptera rhinotermitidae*), entre outros. No entanto, sua patogenicidade tem sido demonstrada ainda para alguns vetores de doenças humanas como o inseto de ordem hemiptera *Triatoma infestans* causador da doença de Chagas (Messias *et al.*, 1986, Silva & Messias, 1986, Luz

et al., 1998), como os mosquitos dos gêneros *Anopheles* sp. e *Culex* sp., maiores causadores da malária e filariose, respectivamente (Kanzok & Jacobs-Lorena, 2006, Scholte *et al.*, 2003, Mohanty *et al.*, 2008).

Devido a esta ampla capacidade de infectar uma gama de artrópodes, *M. anisopliae* tem sido extensivamente estudado; e por isso apresenta uma variedade de ferramentas e informações em bancos de dados estão disponíveis: promotores caracterizados para a expressão de genes de interesse (Nakazato *et al.*, 2006); banco de dados de bibliotecas de etiquetas de sequências expressas (ESTs) (Freimoser *et al.*, 2003, Dutra *et al.*, 2004, He & Xia, 2009, Wang *et al.*, 2005a, Zhang & Xia, 2009, Peng *et al.*, 2009), estudo funcional de genes através da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, (Staats *et al.*, 2007, Boldo *et al.*, 2009). Essas ferramentas proporcionam vantagens tanto para elucidar grande parte do conhecimento sobre a patogenia causada por *Metarhizium*, quanto para produção de novas linhagens com a superexpressão de genes específicos a fim de aumentar a virulência do entomopatógeno e conseqüentemente obter um biocontrole mais eficiente (Screen *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Classificação das Espécies do Complexo *Metarhizium*.

NOMENCLATURA ANTERIOR	
ESPÉCIES	REFERÊNCIAS
<i>Metarhizium album</i>	(Driver <i>et al.</i> , 2000)
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	(Driver <i>et al.</i> , 2000)
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidotum</i>	
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i>	
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>dcjnyium</i>	(Dong <i>et al.</i> , 2007)
<i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	
<i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>minus</i>	
<i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>novazelandicum</i>	(Driver <i>et al.</i> , 2000)
<i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i>	
<i>Metarhizium flavoviride</i> Tipo E	
<i>Cordyceps brittlebankisoides</i>	(Yi Liu <i>et al.</i> , 2001)
<i>Cordyceps campsosterni</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
<i>Cordyceps taii</i>	(Liang <i>et al.</i> , 1991)
NOVA NOMENCLATURA	
ESPÉCIES	REFERÊNCIAS
<i>Metarhizium anisopliae</i>	
<i>Metarhizium guizhouense</i>	
<i>Metarhizium pingshaense</i>	
<i>Metarhizium brunneum</i>	
<i>Metarhizium acridum</i>	
<i>Metarhizium lepidotae</i>	(Bischoff <i>et al.</i> , 2009)
<i>Metarhizium majus</i>	
<i>Metarhizium globosum</i>	
<i>Metarhizium robertsii</i>	
<i>Metarhizium flavoviride</i>	
<i>Metarhizium frigidum</i>	
<i>Metacordyceps brittlebankisoides</i>	
<i>Metacordyceps campsosterni</i>	(Sung <i>et al.</i> , 2007)
<i>Metacordyceps taii</i>	

1.2. Controle biológico por fungos entomopatógenos

O setor agrícola demonstra fortes indicativos de um grande problema de resistência de pragas associadas aos pesticidas químicos, por esse motivo, há um crescente interesse na exploração de fungos para o controle de insetos-praga, plantas daninhas e doenças de plantas. A utilização de mecanismos naturais no combate de pragas da agricultura e pecuária através do biocontrole por fungos entomopatogênicos apresenta grandes vantagens como redução de impactos ambientais, custos e o desenvolvimento de insetos resistentes quando comparado aos pesticidas químicos (Butt *et al.*, 2001, Shah & Pell, 2003, Milner, 2000, Wang & Powell, 2004).

Ao contrário de outros sistemas de biocontrole utilizados como bactérias e vírus, os fungos entomopatogênicos são os mais bem empregados quer como componente de uma estratégia de manejo integrado de pragas ou como micoinseticida; além disso, não necessitam de ingestão pelo hospedeiro para causar a doença. Os fungos infectam insetos por penetração direta da cutícula, dessa forma estes se tornam o único meio prático de controle microbiano para muitas espécies de coleópteros e para insetos que se alimentam de sucos vegetais ou animais que não possuem doença conhecida causada por vírus e bactérias (Bateman, 1992, Milner, 1992).

Além destas vantagens, os fungos entomopatogênicos são amplamente distribuídos no Reino Fungi, tendo entre 400 e 500 espécies de fungos das quais apresentam propriedades entomopatogênicas (incluindo as sub-divisões: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina e Deuteromycotina). Alguns destes entomopatógenos têm uma série restrita de hospedeiros, como por exemplo, a espécie *Aschersonia aleyroids* da qual infecta apenas cochonilhas, e mocas brancas, enquanto que outras espécies dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* possuem uma ampla gama de hospedeiros, por isso, representam aquelas mais utilizadas para este fim (Clarkson & Charnley, 1996, Freimoser *et al.*, 2005, Danfa & Van der Valk, 1999, Kirkland *et al.*, 2004). Destes gêneros, *Metarhizium* é um dos entomopatógenos mais importante e estudado no tocante ao controle de pragas; devido a sua enorme variabilidade genética, que resulta em linhagens com diferentes graus de virulência,

especificidade, produção de conídios e resistência à ultravioleta (Lübeck *et al.*, 2008, Rangel *et al.*, 2006). Esse gênero possui a capacidade de infectar mais de 300 espécies de artrópodes e mais de 50 famílias de insetos e ácaros (St Leger, 2008).

Mesmo apresentando vantagens como especificidade e ampla gama de hospedeiros, há um grande revés na utilização de *Metarhizium* e outros entomopatógenos como biocontroladores, que é o tempo decorrido entre a infecção e a morte do hospedeiro, pois o inseto infectado pode sobreviver de 5 a 10 dias, e conseqüentemente pode causar sérios danos à lavoura (Frazzon *et al.*, 2000, St Leger *et al.*, 1996d). Por isso, o estudo de linhagens naturalmente mais virulentas e com padrões de crescimento e germinação melhores, são essenciais para o desenvolvimento de biopesticidas com formulações comerciais bem sucedidas que reduzem o tempo de vida do hospedeiro pós-infecção (Lübeck *et al.*, 2008, Screen *et al.*, 2001, St Leger *et al.*, 1996d).

No Brasil, *Metarhizium* vem sendo empregado principalmente no controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), da broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*), da broca do café (*Diploschema rotundicollee*), e da cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*) (Alves, 1998, Acevedo *et al.*, 2007, Machado & Filho, 2006). Atualmente inúmeros estudos têm sido realizados para avaliar a susceptibilidade de espécies de artrópodes à infecção por *Metarhizium*, que incluem vetores de doenças humanas, pragas da agricultura e pecuária, (Tabela2).

Tabela 2 – Espécies de artrópodes hospedeiros de *M. anisopliae*.

Espécies suscetíveis à <i>Metarhizium</i>	[Ordem:Família]	Descrição	Referências
<i>Diploschema rotundicolle</i>	[Coleoptera: Cerambycidae]	Broca dos citros	(Machado & Filho, 2006, Alves, 1992)
<i>Hypothenemus hampai</i>	[Coleoptera: Scolytidae]	Broca do café	(Bustillo <i>et al.</i> , 1999)
<i>Culex quinquefasciatus</i>		Vetor da filariose	(Lacey <i>et al.</i> , 1988, Scholte <i>et al.</i> , 2003)
<i>Aedes aegypti</i>	[Diptera: Culicidae]	Vetor da dengue	(Luz <i>et al.</i> , 2008, Scholte <i>et al.</i> , 2007)
<i>Anopheles gambiae</i>		Vetor da malária	(Scholte <i>et al.</i> , 2003, Mnyone <i>et al.</i> , 2010, Scholte <i>et al.</i> , 2005)
<i>Glossina ssp</i>	[Diptera: Glossinidae]	Mosca tse-tsé	(Kaaya & Munyinyi, 1995)
<i>Musca domestica</i>	[Diptera: Muscidae]	Mosca	(Barson <i>et al.</i> , 1994, Mishra <i>et al.</i> , 2010)
<i>Mahanarva posticata</i>		Cigarrinha da folha da cana-de-açúcar	(Alves, 1998)
<i>Mahanarva fimbriolata</i>	[Hemiptera: Cercopidae]	Cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar	(Filho <i>et al.</i> , 2003, Dinardo-Miranda <i>et al.</i> , 2004)
<i>Deois flavopicta</i>		Cigarrinha das pastagens	(Alves, 1998)
<i>Dysdercus peruvianus</i>	[Hemiptera: Pyrrhocoridae]	Percevejo manchador do algodão	(Lübeck <i>et al.</i> , 2008)
<i>Triatoma infestans</i>	[Hemiptera: Reduviidae]	Transmissor da doença de Chagas	(Luz <i>et al.</i> , 1998, Juárez <i>et al.</i> , 2000)
<i>Tibraca limbativentris</i>	[Heteroptera: Pentatomidae]	Percevejo do colmo do arroz	(Martins <i>et al.</i> , 2004, Rampelotti <i>et al.</i> , 2007)
<i>Zulia entreriana</i>	[Homoptera: Cercopidae]	Cigarrinha das pastagens	(Alves, 1998)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>			(Frazzon, 2000, Leemon & Jonsson, 2008)
<i>Ixodes scapularis</i>	[Ixodida: Ixodidae]	Carrapato que parasita bovino	(Benjamin <i>et al.</i> , 2002, Hornbostel <i>et al.</i> , 2005)
<i>Diatrea saccharalis</i>	[Lepidoptera: Piralidae]	Broca da cana-de-açúcar	(Acevedo <i>et al.</i> , 2007, Alves, 1998)
<i>Manduca sexta</i>	[Lepidoptera: Sphingidae]	Lagarta da folha do tabaco	(St Leger <i>et al.</i> , 1996a)
<i>Shistocerca gregaria</i>	[Orthoptera: Acrididae]	Gafanhoto do deserto	(Nowierski <i>et al.</i> , 1996)

1.3. Mecanismo de patogênese por *M. anisopliae*

1.3.1. Interações patógeno-hospedeiro

As interações patógeno-hospedeiro envolvem múltiplos eventos antes de ocorrer uma infecção bem sucedida. Ao contrário de outros entomopatógenos como bactérias e vírus, *M. anisopliae* não necessita ser ingerido para infectar seus hospedeiros; pois possui a capacidade de penetrar ativamente no exoesqueleto ou na cutícula do inseto (Clarkson & Charnley, 1996). *Metarhizium*, quando entra em contato com o inseto-hospedeiro, enfrenta não somente barreiras físicas como o exoesqueleto rígido e o intestino médio revestido de membrana peritrófica, como também respostas coordenadas de hemócitos e a síntese de peptídeos antimicrobianos (Gillespie *et al.*, 1998).

Durante a penetração cuticular, as células fúngicas são continuamente alteradas, e respondem a mudanças do ambiente através de processos bioquímicos e diferenciação celular para formar uma série de estruturas morfológicas específicas. Dentre estas estruturas, os tubos germinativos de *M. anisopliae* diferenciam-se em apressório (localizado na superfície da cutícula), grampo de penetração (na epicutícula), hifas penetrantes (na procutícula) e corpos hifais leveduriformes (blastosporos) para sua completa disseminação na hemocele do hospedeiro (Figura 2). Estas transições morfológicas estão constantemente se ajustando de acordo com o ambiente em que as células fúngicas se encontram, a fim de colonizar tecidos de insetos e combater potenciais repostas do sistema imune hospedeiro (Hajek & St. Leger, 1994, Arruda *et al.*, 2005). Além de estruturas infectivas produzidas por *Metarhizium*, a secreção de diversas enzimas hidrolíticas, das quais dissolvem a barreira hospedeira, confere uma forte vantagem seletiva para o estabelecimento da patogênese (Schrank & Vainstein, 2010).

Para um processo de infecção efetivo, o primeiro passo anterior a penetração é a adesão dos conídios do fungo na cutícula do hospedeiro. A fixação do conídio na superfície hospedeira envolve um mecanismo de adesão não-específico mediado pela hidrofobicidade da parede celular do propágulo (Boucias *et al.*, 1988). Dessa forma, o reconhecimento de um hospedeiro

suscetível pode incluir tanto fatores topológicos da estrutura da superfície como a composição química da cutícula. A cutícula do inseto-hospedeiro é a primeira barreira a ser transposta pelo entomopatógeno. E esta é formada por três camadas evidentes: a exocutícula, endocutícula e epicutícula, sendo esta última a camada mais fina que cobre as duas primeiras formando a procutícula (Arruda *et al.*, 2005). A camada mais externa da epicutícula é composta principalmente por lipídeos, o que confere resistência a degradação enzimática e a exposição da água, a não ser que seja perturbada fisicamente, esta camada de lipídeos pode prevenir a passagem de enzimas fúngicas degradadoras de cutícula (Pedrini *et al.*, 2007, Golebiowski *et al.*, 2011).

Para transpor a principal barreira do hospedeiro (cutícula), o entomopatógeno utiliza a combinação de pressão mecânica e enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e quitinases) (Dutra *et al.*, 2004). O estágio crucial para o estabelecimento de patogenicidade por *M. anisopliae* é a formação de apressório, pois esta estrutura especializada exerce pressão mecânica para facilitar o rompimento da cutícula do hospedeiro. O mecanismo de diferenciação celular desta estrutura envolve o crescimento polarizado, a dilatação do ápice da hifa e o reforço da parede celular (Clarkson & Charnley, 1996). Uma vez que ocorre a ruptura desta barreira pelo fungo, o progresso da hifa de penetração pode ser mais ou menos direto, através de hifas penetrantes ou pela formação de estruturas de penetração que também podem se estender lateralmente (Hajek & St. Leger, 1994).

Quando as hifas de *M. anisopliae* alcançam a hemolinfa (fluido circulatório que banha diretamente os órgãos do inseto) se diferenciam em maior proporção sob estruturas unicelulares leveduriformes chamadas blastosporos, e em menor proporção sob forma vegetativa. A diferenciação em blastosporos pode auxiliar na disseminação e colonização do fungo na hemocele, na otimização à captação de nutrientes pelo aumento da área de superfície, e na subversão do sistema imune celular do hospedeiro. Neste estágio de disseminação o fungo consome completamente os nutrientes da hemolinfa, evitando a penetração nos órgãos internos até a morte do inseto-hospedeiro (Clarkson & Charnley, 1996, Kanzok & Jacobs-Lorena, 2006). Essa estratégia do fungo durante a disseminação pode

incluir a produção de toxinas, como as destruxinas (DTX) que causam paralisia tetânica levando à morte do inseto (Pal *et al.*, 2007), reduzindo o impacto da resposta imune celular do hospedeiro. Sendo pouco compreendida a captação de nutrientes durante esta fase na hemolinfa, (Zhao *et al.*, 2006).

Após a morte do inseto, o micélio emerge do cadáver e todos os tecidos internos são penetrados por hifas filamentosas, no entanto não ocorre a desintegração destes, pois os patógenos secretam substâncias antibacterianas das quais mumificam o hospedeiro (Fang & Bidochka, 2006). Na superfície dos cadáveres são produzidos esporos dos quais subsequentemente infectam outros hospedeiros suscetíveis, sendo que a colonização dos diversos órgãos tem a seqüência: corpos gordurosos, sistema digestivo e túbulos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso, músculos e traquéias (Alves, 1998).

1.3.2. Fatores que determinam virulência a *M. anisopliae*

Inúmeros fatores podem aumentar a virulência do fungo durante a infecção no hospedeiro. A habilidade de um fungo patógeno humano crescer a 37°C e pH fisiológico, por exemplo, é considerado um fator de virulência de fungos dimórficos que invadem tecidos profundos e transitam para uma forma parasitária, essencial para sua patogenicidade (Hogan & Klein, 1996). Dessa maneira, possíveis fatores de virulência de *Metarhizium* se aplicam ao estudo de genes cuja função quando suprimida ou exacerbada altera o significativamente sua capacidade infectiva frente ao hospedeiro. Ou então, o estudo da expressão gênica de *M. anisopliae* em condições que mimetizam a infecção, sob diferentes abordagens através de transcriptomas, proteomas e secretomas, tem nos fornecido pistas dos possíveis fatores de virulência que regulam cada etapa do ciclo de infecção de *M. anisopliae*.

Diversas proteínas secretadas em meios de cultivos específicos que mimetizam condições de infecção (contendo cutícula ou hemolinfa de insetos) têm sido descritas (St Leger *et al.*, 1995, Lübeck *et al.*, 2008, Barreto *et al.*, 2004, De Moraes *et al.*, 2003, St Leger *et al.*, 1996a, Manalil *et al.*, 2010). Além disso, proteínas ligadas à parede celular fúngica, tais como: proteases, tripsinas, lipases, quitinases, uma trealase, e enzimas envolvidas no estresse oxidativo como SOD

e catalase, também têm sido identificadas através de zimogramas e imunocitoquímica (Santi *et al.*, 2010, Bittencourt *et al.*, 2004, St Leger *et al.*, 1996c).

Dutra *et al.* (2004) identificaram ESTs, através da análise da diferença representacional de transcritos (RDA), a partir da comparação de populações de transcritos expressas em cultivos contendo cutícula de *R. microplus* (condições que mimetizam a infecção por *M. anisopliae*) e em cultivos contendo apenas glicose como fonte de carbono. Dentre os genes que apresentaram seus níveis transcricionais alterados em presença de cutícula estão: uma α -1,3-exoglucanase, a protease Pr1C, uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma proteína integral de membrana (PTH11), uma flavohemoglobina, uma transaldolase e outros genes relacionados à proteínas antioxidantes (catalase e HSP70). Os autores sugerem que estes genes possivelmente estão envolvidos na patogenicidade de *M. anisopliae*.

Análises comparativas entre bibliotecas de ESTs de *M. anisopliae* e *M. acridum* apresentaram uma elevada porcentagem de depolimerases secretadas em condições mimetizando a infecção e colonização no hospedeiro. E ainda outros genes relacionados à patogenicidade como proteases, quitinases, fosfolipases, lipases, esterases e fosfatases também foram expressos em ambas bibliotecas (Freimoser *et al.*, 2003). Além disso, Wang *et al.*, (2005a) revelaram o envolvimento de diferentes conjuntos de genes na adaptação fisiológica do fungo no hospedeiro através de análises por ESTs e microarranjo de genes diferencialmente expressos por *M. anisopliae*, crescido em três diferentes condições: exudatos de raízes de planta, cutícula e hemolinfa de *M. sexta*. Na condição de cutícula, os transcritos mais representativos foram de proteases, porém ausentes na condição de hemolinfa. Genes relacionados à glioxal oxidase, fosfocetolase, e uma proteína controladora do ciclo circadiano foram abundantes na condição de hemolinfa, além da detecção de outros genes envolvidos na detoxificação de toxinas (formato desidrogenase e aldeído desidrogenase). Sendo estes últimos expressos em abundância na condição de exudatos de raízes de planta, além da protease Pr1A. Autores sugerem que a capacidade de adaptação fisiológica que surge a partir desses genes diferencialmente expressos envolve

diferentes mecanismos de percepção, propriedades de superfície celular, cadeias de transdução de sinal, e respostas fisiológicas (Wang *et al.*, 2005a).

Já He & Xia (2009) analisaram biblioteca de cDNA normalizada de *M. acridum* em estágios de germinação e diferenciação sobre asas de *Locusta migratoria*. Os transcritos com maior representatividade estão envolvidos no metabolismo de lipídios. Esses genes relacionados ao metabolismo de lipídios não têm sido identificados em bibliotecas de cDNA de *M. anisopliae* crescido em meio líquido, sugerindo que as diferentes condições de crescimento podem tanto influenciar o metabolismo lipídico fúngico, ou reprimir a utilização de lipídios pelo fungo.

Foram identificadas 120 ESTs superexpressas *in vivo* por *M. anisopliae* na hemolinfa do hospedeiro, que possuem alta similaridade com proteínas de categorias funcionais conhecidas. Dentre estas incluem as que apresentaram homologia com uma 1-2-manosiltransferase (glicosila proteínas na biossintese da parede celular fúngica), uma glicosiltransferase (envolvida na integridade e reorganização da parede celular), uma enolase (participa da via glicolítica), uma pisatina dimetilase (enzima detoxificante), preniltransferase (catalisa a condensação de isoprenil difosfato a difosfato alílico), uma colina desidrogenase (formação de glicina betaína oxidativa a partir de colina), entre outras. Essa diversidade funcional sugere que uma série muito complexa de mecanismos moleculares é necessária para a sobrevivência e adaptação de *Metarhizium* na hemolinfa do hospedeiro (Zhang & Xia, 2009).

Gao *et al.*, (2011) revelaram genes candidatos que controlam patogenicidade, especificidade de hospedeiro e estilos de vida saprofítica alternativa de espécies de *Metarhizium* que evoluíram a estilos de vida muito diferentes *M. anisopliae* ARSEF23 (espécie generalista) e *M. acridum* (espécie especialista) através de análises transcriptômicas comparativas. Tanto *M. anisopliae* quanto *M. acridum* frente seus respectivos hospedeiros (*Periplaneta americana* e *Locusta migratoria*) apresentaram um alto nível de transcritos associados à tradução (proteínas ribossomais) e modificações pós-traducionais (proteínas de choque térmico) em estágios de germinação e crescimento.

Apesar de Wang *et al.* (2005a) demonstrarem que o remodelamento da parede celular é fundamental durante eventos de pós-penetração, pois 20% dos genes induzidos pela hemolinfa do hospedeiro estão envolvidos na formação de parede celular. Segundo Gao *et al.*, (2011) é demonstrado que durante a formação do apressório entre 6 e 10% dos genes altamente expressos, de ambas espécies de *Metarhizium*, codificam proteínas da parede celular. Isto sugere que diversos subgrupos de genes atuam antes e após a penetração da cutícula. Ainda, poucas proteases foram abundantemente expressas por ambas espécies de *Metarhizium*, e duas tripsinas foram altamente expressas apenas na espécie *M. anisopliae* infectando superfícies cuticulares.

Além disso, diversos genes envolvidos no reconhecimento de sinais de privação de nitrogênio são expressos em ambas espécies durante estágios iniciais da secreção de proteases. O perfil de expressão de desidrogenases produzidas por *M. anisopliae* crescido em cutículas de gafanhoto e barata apresentou maior correlação, quando comparado a *M. acridum*. E os transcritos de desidrogenases que foram mais abundantemente expressos por *M. anisopliae* nessas condições de cultivo, incluem enzimas envolvidas na glicólise, no ciclo do ácido cítrico e no ramo oxidativo da via pentose fosfato. Genes envolvidos em outras vias do metabolismo intracelular de lipídios, proteínas e aminoácidos também foram altamente expressos, o que reforça a importância de lipídios na reserva nutricional, e a alta rotatividade de proteínas durante a formação do apressório. O aumento no nível transcricional dos genes que codificam proteína G, subunidades alfa, fosfolipase C fosfatidil-inositol específica, proteína quinase C, quinase dependente Ca/calmodulina, e uma proteína quinase extracelular, indica que a via da proteína quinase mitógeno ativada foi fortemente ativada por *M. anisopliae* infectando ambos insetos, e por *M. acridum* infectando gafanhoto. Estes resultados sugerem que *M. anisopliae* e *M. acridum* são capazes de diferenciar diversos estímulos dos hospedeiros utilizando diferentes vias de sinalização que estão provavelmente sob o controle sutil e sofisticado de vias metabólicas cruzadas (Gao *et al.*, 2011).

Diversos genes indicados como determinantes de virulência, têm sido caracterizados através de abordagens funcionais para cada estágio do processo de infecção de *Metarhizium*. A seguir abordaremos alguns destes genes.

1.3.2.1. Estágio de adesão

No contato inicial entre o fungo e seu hospedeiro, diversas proteínas podem ser responsáveis pela aderência do esporo fúngico na superfície cuticular do hospedeiro. Dentre elas, as hidrofobinas, uma classe de proteínas com baixa massa molecular, ricas em resíduos de cisteína, e de característica anfipática, parecem ter um papel importante na adesão do esporo em superfícies hidrofóbicas como às cutículas de hospedeiros (Wessels, 1996, Boucias *et al.*, 1988). Outras proteínas como a adesina (MAD1), presente na superfície do esporo, mostraram envolvimento no estágio de adesão. A supressão deste gene, através de mutantes nulos, diminuiu significativamente a capacidade adesiva dos esporos sobre cutículas de gafanhotos. Ensaio de adesão mostraram que apenas 5,3% dos conídios da linhagem Δ Mad1 se aderiram em comparação à >90% do tipo selvagem (Wang & St Leger, 2007a). Outro gene que mostrou provável envolvimento nesta fase de adesão do fungo, é o *MaPKA1* que codifica a subunidade catalítica da proteína kinase A classe 1. A deleção desta subunidade catalítica, pela construção de uma linhagem mutante, mostrou apenas 15% de adesão dos esporos na cutícula *Galleria mellonella* enquanto que a linhagem selvagem 92% (Fang *et al.*, 2009).

Estudos recentes demonstram que lipases secretadas por *M. anisopliae*, podem estar potencialmente envolvidas no processo de infecção. Ainda, as lipases podem ser identificadas na superfície de conídeos e a degradação da camada lipídica do hospedeiro pode ser importante para o reconhecimento de um hospedeiro suscetível, como também uma fonte nutricional para auxiliar o início da germinação (Silva *et al.*, 2009). Ensaio, utilizando esporos previamente tratados com inibidor de lipases, impediram que o fungo causasse infecção sobre o carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, como também inibiram completamente sua atividade lipotífica (Da Silva *et al.*, 2009).

Outra proteína que parece atuar no estágio de adesão é a CWP10 (proteína de parede celular e não hidrofóbica) de *M. anisopliae*. A expressão desta proteína no fungo *Beauveria bassiana* não apresentou efeito sobre a tolerância do conídio a estresses térmicos e por ultravioleta. Entretanto, causou um aumento de 10,8% na hidrofobicidade do conídio e sua capacidade adesiva em superfícies hidrofóbicas aumentou 1,3 vezes. Isto sugere que além das hidrofobinas, proteínas de característica não-hidrofóbicas podem contribuir na hidrofobicidade do conídio e adesão das espécies fúngicas (Li *et al.*, 2010a). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), essencial na via glicolítica, parece ter um importante papel tanto na fisiologia de *Metarhizium* quanto em suas interações com o hospedeiro. Esta proteína foi imunolocalizada na superfície da célula fúngica; e ensaios em asas de inseto mostraram uma forte atividade adesiva desta proteína no hospedeiro. Estes resultados implicam uma especificidade quanto a esta função adesiva de GAPDH e um provável papel nos estágios iniciais de infecção (ligação do conídio ao hospedeiro) (Broetto *et al.*, 2010).

1.3.2.2. Estágio de penetração

Para a formação do apressório, etapa determinante na patogênese por *Metarhizium*, diversos processos morfogenéticos são necessários, como o crescimento polarizado, a dilatação do ápice da hifa e o reforço da parede celular. A pré-penetração envolve a combinação de pressão mecânica exercida por esta estrutura especializada (apressório) e diversas enzimas hidrolíticas que atuam em sinergia para a formação desta estrutura e o rompimento da cutícula do hospedeiro (Clarkson & Charnley, 1996). Algumas destas enzimas são consideradas determinantes de virulência de *Metarhizium*, como a protease Pr1A (Leger *et al.*, 1987) e as quitinases CHI2 (Boldo *et al.*, 2009) e CHI3 (Staats, 2007). Ao passo que linhagens mutantes para estes genes de quitinases mostraram virulência reduzida em comparação ao tipo selvagem, frente ao inseto hospedeiro *Dysdercus perivianus*.

Uma perilipina, MPL1, proteína formadora de gotículas de lipídeos que geram turgor no interior da célula de *M. anisopliae*, parece auxiliar diretamente na

formação do apressório. Linhagens inativadas para este gene apresentaram menor número de gotículas de lipídeos, tubos germinativos mais finos e pressão de turgor no apressório dramaticamente; e conseqüente diminuição da patogenicidade destes mutantes frente a cutículas de larvas de *Manduca sexta* (Wang & St Leger, 2007b). Em outro estudo foi demonstrado que linhagens inativadas para o gene *Mapka1* (subunidade catalítica da proteína quinase 1) tiveram o desenvolvimento do apressório prejudicado e mostraram-se quase avirulentas contra *Galleria mellonella* (Fang *et al.*, 2009).

Ainda, em ensaios de germinação e formação de apressórios sobre asas de *Locusta migratoria*, foi observada a indução dos apressórios somente em algumas regiões da asa do gafanhoto *Locusta migratoria*, e em outras regiões houve apenas o crescimento de hifas alongadas sem a formação de apressório. Este fato pode estar relacionado provavelmente pela distribuição desigual dos componentes da cutícula ou pela diferença na topografia das diferentes partes da asa (He & Xia, 2009).

1.3.2.3. Estágio de colonização

A diferenciação do fungo na hemolinfa pode adquirir diferentes tipos celulares: blastosporos (células arredondadas tipo levedura), corpos hifais, protoplastos e em menor proporção crescimento micelial. Propágulos infectivos como blastosporos ou corpos hifais são estruturas fundamentais para dispersão, colonização e aquisição de nutrientes de *M. anisopliae*, no entanto, podem ser reconhecidas por hemócitos do hospedeiro (Clarkson & Charnley, 1996). Por essa razão, patógenos fúngicos tem evoluído estratégias sofisticadas para sobrepujar diversas barreiras impostas pelo ambiente hospedeiro (Zhang & Xia, 2009). O gene *Mcl1* (codifica uma proteína tipo colágeno), expresso 20 minutos após atingir a hemolinfa, está relacionado à habilidade de *Metarhizium* evitar o reconhecimento de seus propágulos pelo sistema imune do inseto-hospedeiro. Esta proteína tipo colágeno funciona como uma capa protetora antiadesiva, pois mascara componentes estruturais antigênicos presentes na parede celular do fungo, como as β -glicanas. Propágulos de linhagens inativadas para este gene foram rapidamente fagocitados por hemócitos e apresentaram correspondente

redução na virulência frente ao hospedeiro *Manduca sexta* (Wang & St Leger, 2006).

A hemolinfa de insetos contém altas concentrações de solutos inorgânicos e orgânicos o que contribui para sua alta pressão osmótica (Chapman, 1998), e isto caracteriza um ambiente de estresse para as células fúngicas. Para sobreviver sob estas condições osmóticas, *M. anisopliae*, produz uma proteína osmosensora (MOS1) que regula respostas celulares a elevada pressão osmótica e adaptações posteriores contribuindo para a colonização na hemolinfa do hospedeiro. Comparado ao tipo selvagem, o silenciamento deste gene nas linhagens transformantes (expressando o anti-senso *Mos1*) demonstrou um atraso na germinação dos esporos, apressórios irregulares e maior sensibilidade ao estresse oxidativo, quando as concentrações de KCl foram aumentadas. Estes efeitos pleiotrópicos produzidos pela repressão de *Mos1* podem ser explicados pela relação deste gene com vias de MAP quinase, que estão envolvidas em grande parte das funções biológicas, incluindo desenvolvimento, resposta ao estresse oxidativo e virulência (Wang *et al.*, 2008).

Uma fosfocetolase de origem bacteriana (*Mpk1*), presente em *Metarhizium* e funcionalmente associada ao metabolismo de pentoses, também parece estar relacionada ao estágio de colonização. O gene *Mpk1* é altamente expresso quando cultivado na hemolinfa de *M. sexta*, ambiente rico em trealose e sua atividade enzimática pode ser induzida por diferentes açúcares como xilose, trealose, glicose e sacarose. Mutantes nulos para o gene (*Mpk1*) tiveram crescimento similar ao tipo selvagem quando cultivados em meio contendo xilose como única fonte de carbono. Entretanto, bioensaios mostraram uma virulência significativamente reduzida das linhagens mutantes frente ao inseto-hospedeiro, quando comparadas ao tipo selvagem. Isto sugere que *Mpk1* de *M. anisopliae* desempenha um importante papel na adaptação de nicho para a propagação fúngica na hemocele do inseto (Duan *et al.*, 2009).

Uma tirosina fosfatase (PTPase) de *M. anisopliae*, purificada a partir de sobrenadantes de cultivo, parece estar sendo produzida durante a fase de colonização na hemolinfa do hospedeiro. Esta enzima de *M. anisopliae* parece ter como alvo uma fosfoproteína de *Locusta migratoria*, que apresenta homologia

com a fosfoproteína trans-Golgi p230 de humanos. Funcionalmente, esta proteína participa do transporte vesicular de proteínas funcionais do compartimento Golgi distal para a membrana plasmática. Neste estudo, os autores demonstram que a PTPase pode especificamente inativar fosfoproteínas da hemolinfa de *L. migratoria*, pela defosforilação, como também interferir no transporte correto de proteínas funcionais como a transferrina, que desempenha um importante papel na resposta imune inata do inseto-hospedeiro (Li *et al.*, 2008).

Após atingir a hemolinfa, *M. anisopliae* produz uma classe de depsipeptídeos cíclicos pertencentes à família das destruxinas. Estes peptídeos são os principais metabólitos secundários gerados pelo fungo durante a infecção, e apresentam atividade tóxica inseticida que acelera a morte do hospedeiro. Sabe-se que as DTXs desempenham um importante papel no enfraquecimento do sistema imune hospedeiro, causando danos ao sistema muscular e túbulos de Malpigi, afetando a excreção e levando a dificuldades na alimentação e mobilidade (Kershaw *et al.*, 1999). Normalmente, insetos infectados procuram locais com temperatura mais elevada, a fim de aumentar sua temperatura corporal e assim inibir o desenvolvimento do microrganismo infectante (Elliot *et al.*, 2002, Roy *et al.*, 2006).

Os isolados de *Metarhizium* que produzem maior quantidade de DTXs, apresentam maior virulência, caracterizando as DTXs como determinantes de virulência (Sree *et al.*, 2008). Existem 38 DTXs ou DTX análogas, e estas são divididas quimicamente em 5 grupos de A a E (Pedras *et al.*, 2002, Hu *et al.*, 2006). A destruxina A de *M. anisopliae* apresentou um papel específico na supressão do sistema imune humoral em insetos (Pal *et al.*, 2007). Em bioensaios, foram detectados esses peptídeos nos insetos após três dias de inóculo fúngico, atingindo níveis máximos de concentração das DTXs antes da morte dos hospedeiros (Skrobek *et al.*, 2008).

Diferentes concentrações de DTXs de *M. anisopliae* induzem o sistema de defesa antioxidante de *Spodoptera litura*, causando estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). EROS induz a peroxidação lipídica severa pela remoção do hidrogênio a partir de ácidos graxos insaturados, levando a formação de radicais livres. Após 1 hora de tratamento com DTXs em

crescentes concentrações, a atividade total de enzimas detoxificantes (superóxido dismutase, catalase, glutational peroxidase e ascorbato peroxidase) aumentou, sugerindo a presença de um eficiente sistema de detoxificação no corpo larval. Entretanto, em 48 horas, as atividades destas enzimas de detoxificação diminuíram causando estresse oxidativo. Isto implica que nesta fase o sistema de detoxificação foi dominado e suprimido pelas DTXs. Ainda, os tratamentos com DTXs causaram redução dose-dependente no peso corporal das larvas (Sree & Padmaja, 2008).

A aquisição de nutrientes pelo fungo durante o estágio de proliferação na hemolinfa do hospedeiro ainda é pouco entendida (Zhao *et al.*, 2006). Porém, estudos demonstraram que os níveis de carboidratos e lipídeos da hemolinfa de gafanhotos adultos da espécie *Schistocerca gregaria*, em comparação ao controle, diminuíram significativamente após 3 dias da inoculação do fungo *M. anisopliae* var *acridum*. Neste estágio de infecção, o fungo já invadiu a cavidade corporal do inseto, porém ainda não cresceu extensivamente na hemolinfa. Autores sugerem que o fungo pode interferir tanto na mobilização das reservas energéticas como competir com o inseto por essas reservas de energia. E uma hipótese alternativa é que enquanto o fungo impede a mobilização de reservas energéticas a partir de corpos gordurosos, o inseto responde à presença do patógeno reduzindo a concentração de açúcares e lipídeos da hemolinfa. Sendo a última, uma tentativa por parte do inseto de restringir o acesso às suas reservas energéticas limitando o crescimento fúngico apenas na hemolinfa antes de sua morte (Seyoum *et al.*, 2002). Ainda, a secreção de uma trealase ácida (enzima degradadora de trealose) por *M. anisopliae* na hemolinfa do inseto parece ser pré-requisito para o sucesso da aquisição de nutrientes pelo patógeno no ambiente hospedeiro (Zhao *et al.*, 2006, Xia *et al.*, 2002).

1.3.2.4. Estágio de extrusão de hifas e conidiação

Quando os recursos energéticos do hospedeiro são exauridos pelo fungo, os órgãos internos do inseto se decompõem devido à perda da integridade das membranas celulares e dos fluidos. Após a morte do inseto, o fungo produz antibióticos para competir com bactérias presentes no intestino do hospedeiro. Na

sequência, sob condições favoráveis de umidade, a cavidade corporal do inseto é preenchida por completo com massa fúngica, até que ocorra a extrusão das hifas germinadas e a formação de conídeos esverdeados, dos quais caracterizam o típico aspecto mumificado (Kanzok & Jacobs-Lorena, 2006).

Dessa forma, o ciclo de vida normal de fungos filamentosos consiste na conidiação após o período de crescimento micelial em resposta a sinais endógenos e fatores do ambiente dos quais limitam a rápida proliferação da fase vegetativa (Anderson & Smith, 1971, Bosch & Yantorno, 1999). Sendo o conídio, o propágulo que inicia a patogênese e dissemina a doença (Fang *et al.*, 2007). É sugerido que o aumento da expressão da subtilisina Pr1, em estágios tardios de patogênese, promova a extrusão das hifas facilitando a conclusão do ciclo de infecção para a mumificação de cadáveres e produção de conídios (Small & Bidochka, 2005).

Reguladores da via de sinalização da proteína G, em fungos filamentosos, têm sido implicados no controle de diversas funções celulares, incluindo conidiação, morfogênese e patogênese. Em *M. anisopliae*, um mutante funcional do gene *cag8* (regulador da via de sinalização da proteína G) apresentou crescimento micelial reduzido, conidiação impedida, perda de pigmentação, formação de blastosporos estruturalmente irregulares e menor virulência frente *G. mellonella*, em comparação ao tipo selvagem. Além disso, o mutante nulo apresentou um nível de transcritos do gene *ssgA* (que codifica uma hidrofobina) reduzido (>200 vezes). Portanto, a partir desses resultados, é sugerido que *cag8* está envolvido na modulação da conidiação, virulência e síntese de hidrofobina em *M. anisopliae* (Fang *et al.*, 2007). Em estudos anteriores, por qPCR, foi observado um maior nível de expressão do gene *cag8* no conídio antes da germinação e durante estágios tardios da conidiogênese no cadáver de inseto (Fang & Bidochka, 2006).

Peng *et al.*, (2009) através de hibridização subtrativa por supressão (HSS), detectaram transcritos preferencialmente expressos durante a conidiogênese com homologia as seguintes proteínas: MAPKK-quinase (MAPKKK), formato desidrogenase NAD-dependente (FDH), HSP70, quitina sintase, proteína ligada a GPI, glicosiltransferase ligada a GPI entre outras. Essas proteínas estão

relacionadas com a conidiogênese em fungos ortólogos. Estes resultados fornecem uma descrição preliminar de genes que podem estar envolvidos na regulação molecular do estágio de conidiogênese por *M. anisopliae*.

Além do padrão normal de produção de conídios, sob certas condições, alguns fungos são capazes de sofrer um ciclo de vida extremamente curto chamado de microciclo, o que ocorre logo após a germinação dos conídios, sem ou com pouquíssimo crescimento micelial. O microciclo na conidiação tem sido proposto como um mecanismo de sobrevivência para o conídio do fungo que encontra condições de crescimento desfavoráveis (Hanlin, 1994, Ahearn *et al.*, 2007, Anderson & Smith, 1971, Lapaire & Dunkle, 2003). Apesar disso, este estágio tem importantes valores práticos na produção de conídios devido ao ciclo de desenvolvimento reduzido. Para elucidar seus papéis na conidiação, foi construído um mutante RNAi do gene *Mmc*, em meio indutor ao microciclo, que apresentou conidiação normal ao invés de conidiação por microciclo com velocidade de crescimento significativamente reduzida e um rendimento de conídios de 5,29 e 3,18 vezes menor, respectivamente, quando comparado ao tipo selvagem. Além disso, o silenciamento deste gene (*Mmc*) não afetou a virulência nem a tolerância a UV-B do conídio. Contudo, este estudo contribuiu na elucidação da regulação da esporulação de *M. anisopliae* (Liu *et al.*, 2010).

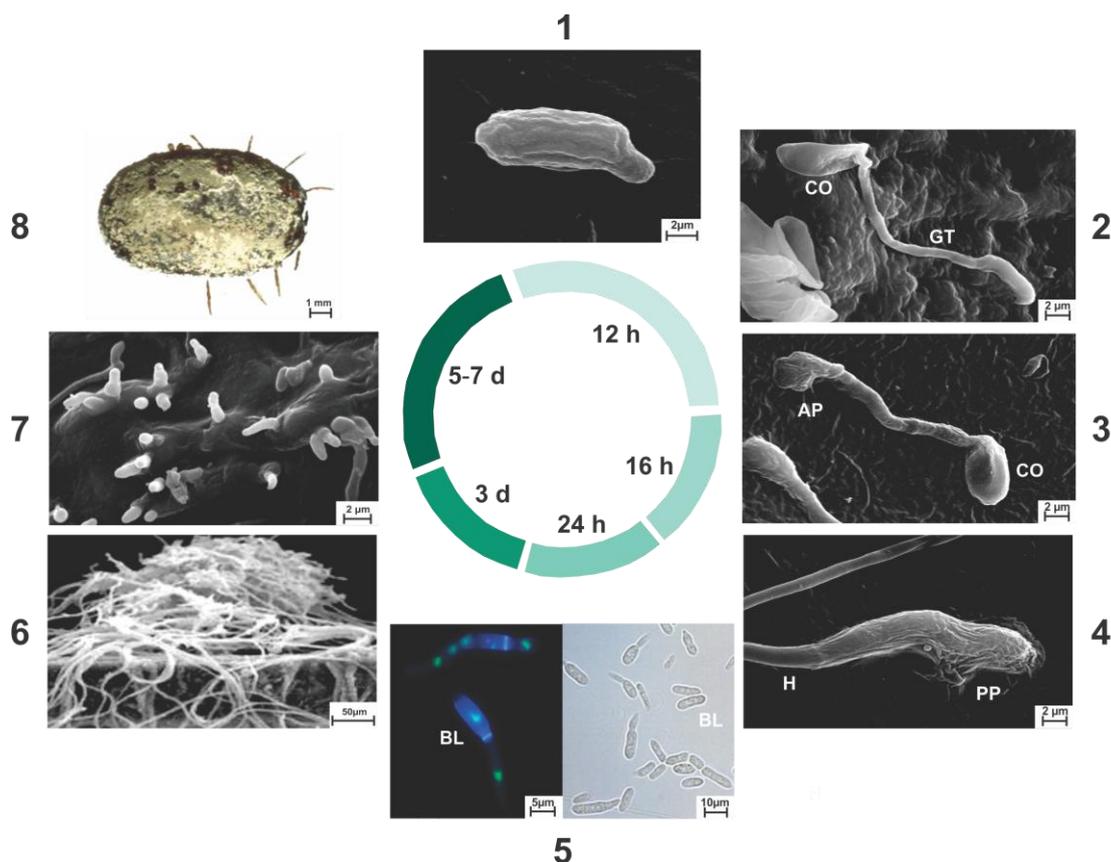


Figura 2 – Estágios do processo de infecção do entomopatígeno *M. anisopliae*. Os eventos do processo de infecção foram realizados utilizando cutículas de carrapato e o meio indutor de blastosporos (Adamék). (1) MEV da adesão do conídio na cutícula do hospedeiro; (2) MEV da germinação do conídio; (3) MEV da diferenciação do tubo germinativo em apressório; (4) MEV da penetração na cutícula do hospedeiro por pressão mecânica e produção de enzimas hidrolíticas; (5) Microscopia óptica da diferenciação de hifas em blastosporos – corpos hifais; (6) MEV da colonização no hospedeiro; (7) MEV da extrusão de hifas na superfície do cadáver do hospedeiro; (8) Produção de conídios e conidióforos sobre o cadáver do carrapato. Co – conídio; GT – tubo germinativo; AP – apressório; PP - grampo de penetração; d – dias; h – horas; MEV – microscopia eletrônica de varredura. (Imagens modificadas de Arruda *et al.*, 2005, Broetto *et al.*, 2010, Schrank & Vainstein 2010).

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa ampliar o entendimento do processo de infecção de *M. anisopliae*, através de duas abordagens relacionadas. A primeira proposta é avaliar a possível função do gene *emp1* de *M. anisopliae* pela análise do perfil transcricional deste gene, por RT-PCR, em diferentes tipos celulares (apressório, hifas e blastosporos) e pela construção de uma linhagem mutante inativada para este gene utilizando agrotransformação. A outra proposta deste trabalho pretende validar transcionalmente quitinases putativas encontradas *in silico* no genoma de *M. anisopliae* (20 são quitinases putativas e 3 já caracterizadas pelo nosso grupo) nos diferentes tipos celulares: apressório, hifas e blastosporos.

A determinação do perfil transcricional de quitinases e o estudo funcional de genes pela geração de mutantes nulos, representam uma perspectiva de contribuição importante tanto para elucidar o papel desses genes nas diferentes funções em que provavelmente atuam no ciclo de vida e de infecção do fungo, quanto para um biocontrole mais eficiente através do melhoramento de linhagens.

Esta dissertação está apresentada em dois capítulos:

Capítulo 1: Estudo da função do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae*.

E

Capítulo 2: Análise transcricional de quitinases durante estágios de formação de apressório, crescimento vegetativo e blastosporos de *Metarhizium anisopliae*.

3. CAPÍTULO 1

Estudo da função do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae*

3.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1. Comparação entre fungos fitopatógenos e entomopatógenos

Dentre os fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* é um dos mais utilizados no controle de insetos-praga, e também um importante modelo para estudos de interações patógeno-hospedeiro (Schrank & Vainstein, 2010). E no que diz respeito aos fungos fitopatógenos, *Magnaporthe grisea* é o principal causador de danos na cultura orizícola e o organismo modelo para elucidação das bases moleculares de doenças fúngicas de plantas (Dean *et al.*, 2005). Apesar de fungos fito e entomopatógenos diferirem em seus papéis na natureza e possuírem hospedeiros diferentes; estes apresentam diversas estratégias em comum desenvolvidas para interagir com seus hospedeiros, que são evolutivamente conservadas.

A diferenciação do tubo germinativo em apressório é uma das etapas mais importante do processo de infecção de fungos fito e entomopatógenos, pois a formação desta estrutura especializada auxilia ambos no rompimento da principal barreira do hospedeiro, a cutícula (Figura 3). Para muitos patógenos, a formação do apressório é desencadeada por estímulos físico-químicos através do contato com a superfície hospedeira (cutícula). Assim, estes estímulos físico-químicos respondem a mudanças metabólicas e morfogênicas das quais são requeridas para o estabelecimento de patogenicidade. Tais mudanças incluem adesão na superfície do hospedeiro, germinação, diferenciação em estruturas de infecção especializadas e secreção de enzimas líticas e toxinas. Apesar de conferir vantagem adaptativa para o patógeno, facilitando o rompimento da cutícula do hospedeiro; a habilidade de produzir apressório é altamente variável dentro de uma mesma espécie (Dean, 1997, Di Pietro *et al.*, 2001).

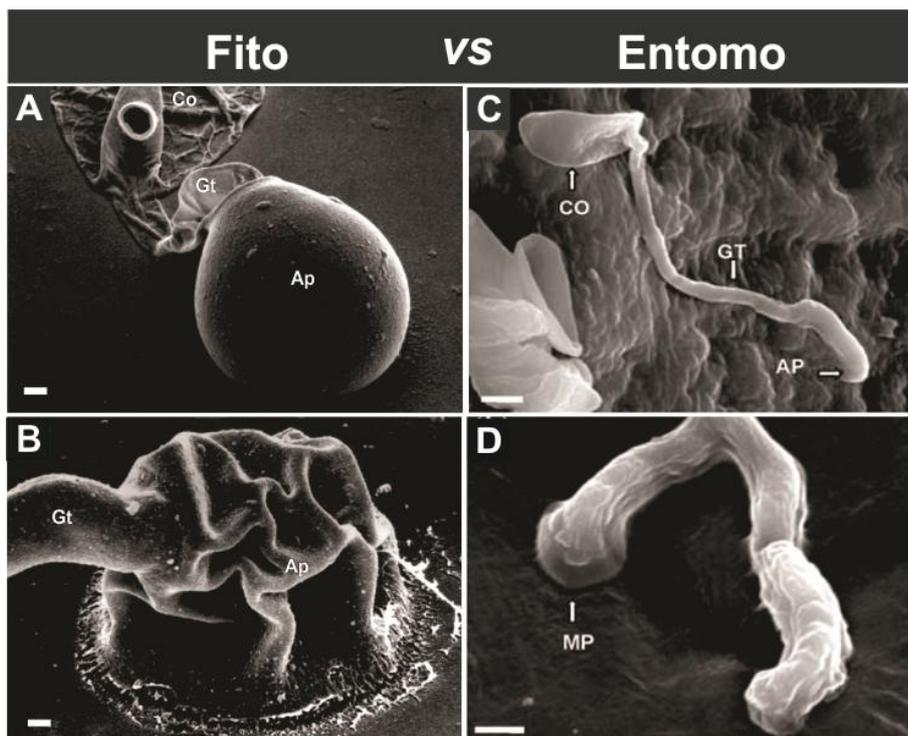


Figura 3 – Comparação entre o aspecto morfológico de apressórios do fungo fitopatígeno *M. grisea* e do entomopatígeno *M. anisopliae*. Microscopia eletrônica de varredura, (A) conídio de *M. grisea* diferenciado em apressório; (B) apressório de *M. grisea* exercendo pressão mecânica sobre a cutícula da planta-hospedeira. Escala: 1 μ m (C) conídio de *M. anisopliae* diferenciado em apressório; (D) Apressório de *M. anisopliae* exercendo pressão mecânica sobre a cutícula do inseto-hospedeiro. Escala – 10 μ m; CO – conídio; GT – tubo germinativo; AP – apressório; MP – pressão mecânica exercida sobre a cutícula do hospedeiro. Escala: 10 μ m (imagem modificada de Howard & Valent, 1996; Arruda *et al.*, 2005).

Diversas abordagens genômicas, transcriptômicas e proteômicas têm nos permitido acesso a um grande número de informações sobre aspectos relacionados aos eventos de diferenciação celular durante o processo de infecção de diferentes espécies fúngicas. Atualmente, em torno de 500 genomas de fungos estão em fase de seqüenciamento, sendo 35 já finalizados e publicados e 454 genomas em fase de montagem e anotação (*GenomesOnline*, www.genomesonline.org). Dentre as espécies entomopatogênicas mais bem estudadas, os genomas de *Metarhizium anisopliae* ARSEF23 e *M. acridum* já foram publicados (Gao *et al.*, 2011), e o genoma de *Beauveria bassiana* está em

fase de montagem e anotação (NCBI, *genomes*). E mais de 15 espécies de fungos fitopatogênicos já têm seu genoma publicado, que incluem *Fusarium oxysporum*, *Ustilago maydis* e *Magnaporthe grisea* (Markowitz *et al.*, 2008, Markowitz *et al.*, 2010).

Além disso, projetos de mutagênese insercional em larga escala têm proporcionado o estudo dos processos pelos quais os fungos infectam seus hospedeiros. Muitos estudos têm se voltado para estágios iniciais da penetração (incluindo a formação do apressório) tanto em fungos entomopatogênicos, mas principalmente em fungos fitopatogênicos (St Leger *et al.*, 1991b, Di Pietro *et al.*, 2001, Brachmann *et al.*, 2003, Ahn *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2010, Gao *et al.*, 2011).

3.1.2. Apressório em fungos fitopatogênicos

3.1.2.1. Diferenciação e fisiologia do apressório

Apressório é definido como uma estrutura celular formada por fungos patógenos, para pressionar e aderir na superfície cuticular do hospedeiro. Frequentemente, os apressórios são claramente estruturas diferenciadas na extremidade dos tubos germinativos. Entretanto, características morfológicas desta estrutura podem ser variáveis, sendo difíceis de distingui-los morfológicamente, pois apresentam apenas uma expansão localizada na extremidade do tubo germinativo. Em alguns fungos, o apressório pode se diferenciar imediatamente após o esporo germinado, enquanto que outros produzem longos tubos germinativos (Dean, 1997). Como também, a diferenciação desta estrutura pode responder morfológicamente a um conjunto variado de sinais físico-químicos incluindo, contato, luz, feromônios, e nutrientes (St Leger *et al.*, 1990).

A formação de apressório por fungos fitopatogênicos, como exemplo, *M. grisea* envolve duas fases de desenvolvimento distintas: 1) reconhecimento: o conídio germina para produzir tubos germinativos curtos, dos quais detectam sinais que induzem a morfogênese do apressório; 2) maturação: envolve a

formação do apressório, diferenciação da parede celular e a deposição de uma camada de melanina que antecede a geração de turgor (Howard & Valent, 1996).

Uma das características mais evidente da célula diferenciada em apressório é a elevada pressão de turgor (força por unidade de área exercida na parede da célula pela água no vacúolo celular) que auxilia mecanicamente o fungo no processo de penetração na cutícula do hospedeiro. O apressório pode exercer uma pressão de turgor de até 8 MPa, sendo esta a mais alta pressão já registrada em qualquer organismo vivo (Howard *et al.*, 1991, Money, 2007). A pressão de turgor é gerada por um influxo rápido de água contra um gradiente de concentração que é produzido pelo acúmulo de solutos presentes no apressório (Tucker & Talbot, 2001, Wang *et al.*, 2005b). Análises bioquímicas destes solutos intracelulares presentes na célula do apressório, demonstraram que o principal componente responsável pela pressão de turgor é o glicerol que acumula em altas concentrações excedendo a 3M no interior da estrutura (De Jong *et al.*, 1997).

Apesar de ainda não compreendermos totalmente como o fungo acumula altas concentrações de solutos (incluindo o glicerol) no apressório, análises de conídios revelaram alguns produtos de armazenamento predominantes. Dentre as potenciais fontes de glicerol e outros solutos compatíveis durante a geração de turgor no apressório estão os lipídios, glicogênio e dissacarídeos, incluindo trealose (Tucker & Talbot, 2001, Money & Howard, 1996). Desse modo o processo de geração de turgor pode envolver a mobilização extensiva de reservas armazenadas no conídio e a síntese *de novo* de poliols no interior do apressório (Dixon *et al.*, 1999). Análises ultraestruturais demonstraram uma alta densidade de glicogênio, em forma de rosetas, presente no crescimento do tubo germinativo e na expansão do apressório; e em menor densidade nos estágios tardios de infecção, indicando um turgor elevado no apressório (Bourett & Howard, 1990).

Posteriormente, Thines *et al.* (2000) demonstraram o transporte e a compartimentalização de glicogênio e de triacilgliceróis durante o desenvolvimento de apressórios, seguido de uma utilização rápida destas reservas durante a maturação celular. O glicogênio degradado é provavelmente uma das principais fontes de energia durante a extensão do tubo germinativo,

além do manitol e da trealose também presentes no conídio (Talbot, 1995, Dixon *et al.*, 1999). Ainda, a síntese de glicerol a partir de carboidratos é provavelmente mediada em apressórios de *M. grisea* não somente pela ação enzimática de glicerol-3-fosfato dehidrogenase (GPD) dependente de NADH, bem como pela redução de dihidroxiacetona e gliceraldeído, dependentes de NADPH.

No processo de diferenciação do apressório, gotículas lipídicas são mobilizadas até a célula, no entanto as maiores gotículas de lipídeos coalescem em um grande vacúolo central antes de degradar no início da lipólise. O sítio de degradação de lipídios que corresponde a grandes vacúolos encontrados no interior do apressório (Thines *et al.*, 2000), são mais proeminentes em apressórios maduros (com grampos de penetração já formados) (Bourett & Howard 1990).

A mobilização de triacilgliceróis e glicogênio durante a geração de turgor no apressório é um processo dependente da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Em *M. oryzae* o gene *Pmk1*, codifica proteína homóloga a uma quinase ativada por mitógenos (MAPK) de *Saccharomyces cerevisiae*, parece ser essencial para a formação do apressório e para o crescimento de hifas infecciosas. Mutantes deletados para o gene *Pmk1*, apesar de reconhecer e responder a superfícies hidrofóbicas ou AMPc exógenos através da expansão da ponta do tubo germinativo, foram incapazes de desenvolver apressórios e de mobilizar lipídios e glicogênio. Além disso, estes mutantes não produziram lesões necróticas em plantas, mesmo inoculando os esporos no tecido foliar ferido. Já em mutantes inativados para o gene *cpkA* (codifica a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de AMPc – PKA) ocorreu a mobilização de lipídios e glicogênio tardiamente e a diferenciação de um apressório diminuto, porém não funcional. E a deleção do gene *Mac1*, que codifica uma adenilato ciclase, resultou em mutantes que não formam apressórios, indicando que a rota em resposta ao AMPc também regula a morfogênese do apressório. No entanto, em mutantes $\Delta mac1 sum1-99$ (mutação na subunidade regulatória de PKA) a degradação de lipídios e glicogênio foi muito rápida, ocorrendo antes da completa morfogênese do apressório (Wilson & Talbot, 2009). Mutantes nocautes de genes de fosfolipases C também demonstraram um ciclo anormal do metabolismo lipídico para a formação do apressório em *M. oryzae* (Choi *et al.*, 2011).

A consequência da lipólise no apressório é a produção de ácidos graxos e glicerol pela ação de triacilglicerol lipases (TAG) por de mecanismos de β -oxidação. Este processo de oxidação de ácidos graxos (β -oxidação) envolve um conjunto de reações consecutivas catalisadas pelas enzimas acyl-CoA oxidase, 2-enoil-CoA hidratase, 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenase e 3-ketoacil-CoA tiolase, que conduzem a formação de acetil-CoA, essencial para a formação do apressório (Wang *et al.*, 2005b).

Uma proteína multifuncional da β -oxidação de ácidos graxos (gene *Mpf1*), com localização peroxissomal demonstrou ter um papel importante na utilização de lipídios e na virulência em *M. oryzae*. A deleção deste gene resultou em mutantes incapazes de utilizar ácidos graxos ou lipídios como única fonte de carbono, mostrando que o comprometimento da função peroxissomal impediu a lipólise no apressório e conseqüentemente a virulência foi atenuada. Entretanto, o turgor nos apressórios das linhagens mutantes não foi significativamente reduzido, quando comparado ao tipo selvagem. Isto sugere que o soluto glicerol provavelmente não é derivado da degradação de ácidos graxos em *M. grisea*. Além disso, a biogênese peroxissomal em *M. grisea*, se mostrou essencial para a formação do apressório. A ausência da biogênese peroxissomal através da inativação do gene *Pex6* (codifica uma peroxina) causou danos significativos na função do apressório, apresentando apressórios menores e disformes quando comparados a linhagem selvagem, bem como a completa perda de patogenicidade. Contudo, os autores sugerem que o metabolismo peroxissomal de ácidos graxos e a geração de acetil CoA podem ser utilizados em uma série de vias bioquímicas do metabolismo secundário como a produção de melanina e a biossíntese poliquetídeos (Wang *et al.*, 2007).

O papel importante da acetil CoA associada a formação do apressório foi evidenciada pela construção de mutantes nulos para o gene *Pth2* (carnitina acetil transferase peroxissomal, CAT) que converte unidades de acetil CoA em acetil-carnitina para o transporte através da membrana. O comprometimento da função do apressório em linhagens mutantes ($\Delta pth2$) está associado ao atraso na mobilização de reservas lipídicas em tubos germinativos diferenciando-se em células de infecção e a distribuição anormal de quitina no apressório. Ainda, a

função de *Pth2* na fisiologia do apressório é disponibilizar acetil CoA na célula para a geração de melanina, glicanas e quitina (Bhambra *et al.*, 2006, Wilson & Talbot, 2009).

A trealose é abundante no conídio e rapidamente degradada durante a germinação do esporo. Em *M. grisea* linhagens mutantes para a principal enzima da biossíntese de trealose (trealose-6-fosfato sintase, $\Delta TPS1$), não produziram trealose, apesar de germinarem e produzirem apressórios normalmente, foram incapazes de infectar plantas (Foster *et al.*, 2003, Wilson *et al.*, 2007). Em *M. oryzae*, a deleção de *TPS1* causou também a perda de patogenicidade, sugerindo que a trealose pode ser importante na geração de turgor nos apressórios (Fernandez & Wilson, 2011).

3.1.2.2. Ciclo celular relacionado à formação do apressório

O processo de diferenciação do apressório em *M. grisea* tem sido diretamente associado à regulação do ciclo celular (Caracuel-Rios & Talbot, 2007). Com a utilização de uma linhagem de *M. grisea* superexpressando uma histona H3 fusionada a GFP, foi possível visualizar o padrão de divisão nuclear deste fungo durante a formação do apressório. Durante a germinação do esporo em superfícies hidrofóbicas, um dos núcleos migra para o tubo germinativo onde ocorre mitose entre 4 e 6 horas. Após ocorrer a mitose um dos núcleos-filhos migra para o apressório incipiente e os outros retornam para o conídio onde são degenerados. E após 24 horas, o apressório maduro está formado com apenas um núcleo. Conídios incubados em presença de nutrientes exógenos, que inibem a formação de apressório em *M. grisea*, apresentaram mitose tardia e núcleos não degenerados. Além disso, foi observada a mitose por análise do mutante $\Delta pmk1$ (proteína quinase ativada por mitógenos) que foi incapaz de formar apressórios e sofreu sucessivas divisões nucleares dentro do tubo germinativo uma vez estendido, no entanto não ocorreu a degeneração de núcleos no esporo. Para avaliar se o apressório é pré-requisito para o desenvolvimento de infecção por *M. grisea*, foram utilizados hidroxiuréia (HU) e benomil para bloquear a progressão do ciclo celular nas transições G1/S ou G2/M, respectivamente. A mitose foi inibida no tubo germinativo e o desenvolvimento do apressório não

ocorreu. Isto demonstra a correlação entre controle mitótico e morte celular por autofagia com a morfogênese relacionada à infecção (formação de apressórios) de *M. grisea* (Veneault-Fourrey *et al.*, 2006).

Estudos recentes em *M. oryzae* demonstram que a posição do septo do apressório é definida antes da mitose pela formação de um complexo heterométrico anel de septina, pelo qual foi espacialmente localizado utilizando proteínas de fusão Septina4:GFP e Septina5:GFP. Mutantes deficientes no desenvolvimento do apressório, $\Delta pmk1$ (*pmk1*, codifica a proteína quinase ativada por mitógenos) e $\Delta cpkA$ (codifica a subunidade catalítica da proteína quinase A dependente de AMPc) sofreram mitose e citocinese no tubo germinativo. Contrariamente, mutantes que formam apressórios morfologicamente normais como $\Delta mts12$ (fator de transcrição que incapacita o mutante de formar hifas de penetração), apresentaram clara separação entre mitose e divisão celular, com a formação do anel de actomiosina no istmo do apressório incipiente. Os autores concluem que o desacoplamento espacial da mitose e citocinese está especificamente associado ao programa morfogenético para a diferenciação do apressório. Em conídios expressando SEP4 e SEP5 fusionadas a GFP, foi observada inicialmente a formação do anel de septina na base do tubo germinativo próximo ao conídio, seguido de um segundo anel de septina formado no istmo do apressório em desenvolvimento. Posteriormente, durante a maturação do apressório, anéis de septina dispersos são degradados em seguida, e um pequeno número de células germinadas apresenta anéis de septina evidentes. Sendo observado que a formação de anéis de septina no sítio futuro da formação do septo sempre ocorre antes do início da mitose. A perturbação no controle espacial da septação através da mutação condicional do gene SEP1 (septação associada 1) aumentou a septação e a divisão celular durante a morfogênese do apressório. No entanto, a superexpressão de Sep1 não afetou a septação, mas levou a liberação da parada do ciclo celular nos núcleos de conídios não germinados. Isto indica que SEP1 é essencial para determinar a posição e a frequência dos sítios de divisão celular, bem como a diferenciação do apressório requer um evento de citocinese que é diferente da divisão celular dentro de hifas (Saunders *et al.*, 2010).

3.1.2.3. Vias de transdução de sinal associadas à diferenciação do apressório

Diversos organismos, incluindo fungos, percebem estímulos ambientais através de mecanismos de transdução de sinal, que pode envolver um estímulo químico ou mecânico. A interação de estímulos com um receptor primário desencadeia uma série de eventos capaz de provocar uma resposta adaptativa, neste caso, formação de apressório. A formação do apressório está associada à relação próxima e íntima entre tubos germinativos emergentes e o substrato, mesmo no caso de uma superfície de plástico inerte (Dean, 1997).

Assim, folhas artificiais de silicone ou de plástico, mimetizando detalhadamente a topografia de folhas de plantas têm sido utilizadas para induzir a formação de apressório *in vitro* de diversos fungos fitopatógenos. Um exemplo é o fitopatógeno *Uromyces appendiculatus* que tem a formação de apressório induzida através de folhas artificiais plásticas mimetizando a topografia das células guarda de estômatos (Allen *et al.*, 1991). Em contraste, fitopatógenos como *Magnaporthe grisea* e *Colletotrichum gloeosporioides* podem responder propriamente a estímulos de superfície de contato (hidrofobicidade e rigidez), sem a necessidade de estímulos topográficos (Dickman *et al.*, 2003, Skamnioti & Gurr, 2007).

Na maioria das vias, geralmente, os sinais extracelulares são transduzidos através de interações proteína-proteína e modulados através de mudanças conformacionais induzidas por ligantes. A compreensão da percepção de sinais em fungos patogênicos que conduzem a formação de apressório é ainda um pouco limitada. Um mecanismo já caracterizado é o mecanorreceptor ou receptor de toque que apresenta canais de cátions mecanossensíveis na membrana plasmática de *U. appendiculatus* envolvidos na sinalização topográfica da superfície. Em experimentos utilizando um inibidor da ativação de canais mecanossensíveis, ocorreu a inibição tanto da despolarização da membrana plasmática de protoplastos quanto da diferenciação de tubos germinativos. Os autores especulam que a topologia da superfície da folha, como o relevo das células guarda, pode causar um estresse na membrana das células fúngicas, resultando em um influxo de íons, dentre eles os de cálcio, que desencadearia a

formação do apressório (Zhou *et al.*, 1991). Estudos posteriores sugerem que a expressão do gene de calmodulina (proteína ligadora de cálcio), em *M. grisea*, é dependente da adesão do esporo na superfície do hospedeiro e é induzida concomitantemente com a formação do apressório. Como também, o diacilglicerol pode induzir a formação de apressório implicando papéis para o cálcio e para proteína quinase C como parte do mecanismo de sensoriamento (Thines *et al.*, 1997).

A importância do cálcio no processo de diferenciação celular de *Colletotrichum gloeosporioides*, é evidenciada através da expressão aumentada de genes de calmodulinas, em condições de contato a superfícies hidrofóbicas e rígidas. É sugerido que o contato com superfícies rígidas induz a sinalização de Ca/Calmodulina preparando o conídio para responder a sinais do hospedeiro pela germinação e diferenciação do apressório (Kim *et al.*, 1998, Uhm *et al.*, 2003).

Ainda, o estudo funcional do gene MCNA (codifica a subunidade catalítica da calcineurina) indica que a calcineurina A desempenha importantes papéis nas vias de transdução de sinal envolvidas na morfogênese associada à infecção e na patogenicidade de *M. oryzae*. Transformantes expressando RNA senso/antisense exibiram redução significativa no crescimento micelial, na conidiação, na formação de apressório e na patogenicidade (Choi *et al.*, 2009).

As fosfolipases C (PLCs) hidrolisam fosfatidilinositol 4,5-bifosfato a 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol, que induz a liberação de Ca^{2+} a partir de estoques intracelulares e a promove ativação de proteínas quinases, respectivamente. Choi *et al.*, (2011) caracterizaram funcionalmente quatro genes codificadores de isoenzimas fosfolipase C (PLC) (MoPLC2 a MoPLC5) que diferem na organização do domínio catalítico X/Y PLC-específico, em *M. oryzae*. A deleção dos genes MoPLC2 e MoPLC3 (codificam fosfolipases C que apresentam domínio de ligação a membrana dependente de cálcio) causou conidiação reduzida e defeitos na penetração mediada por apressório, porém estes mutantes não apresentaram defeitos de sensoriamento e morfologia do apressório. Ainda, a complementação desses genes restaurou as funções defectivas das linhagens $\Delta Mopl2$ e $\Delta Mopl3$. A semelhança nos defeitos fenotípicos destes mutantes

indica que ambos genes são importantes na regulação de níveis apropriados de moléculas sinalizadoras (Choi *et al.*, 2011).

As integrinas ou glicoproteínas transmembranas, estão presentes em diferentes grupos de organismos. Em células de mamíferos, estas proteínas desempenham um papel central na adesão celular e na transdução de sinal. Em fungos fitopatógenos, a atividade das integrinas é mediada por outras proteínas da matriz extracelular, como vitronectrina e fibronectina, que apresentam domínios contendo os resíduos de aminoácidos RGD. A adesão e função celular pode ser bloqueada por mascarar os domínios extracelulares do receptor da integrina com peptídeos (RGD) (Dean, 1997). Correa *et al.*, (1996) demonstraram que a formação de apressório pode ser inibida por peptídeos contendo RGD em *U. appendiculatus*. Estudos posteriores evidenciam que o efeito de anticorpos anti fibronectina humana (HFA) e peptídeos (RGD) inibe a adesão do conídio e na formação de apressório de *M. oryzae*. Entretanto, quando adicionado AMP cíclico (AMPC) estas funções foram restauradas. Isto sugere o envolvimento de proteínas de matriz extracelular na adesão dos conídios e na formação do apressório, por receptores do tipo integrinas e da modulação da sinalização dependente de AMP cíclico (Bae *et al.*, 2007).

O AMP cíclico atua principalmente através da ativação da proteína quinase dependente de AMPC (PKA); bem como desempenha um papel central na indução da formação do apressório em certos fungos (Dean 1997). Em *M. grisea*, linhagens mutantes para o gene *cpkA* (subunidade catalítica da proteína quinase dependente de AMPC) foram capazes de formar apressórios em superfícies hidrofílicas, pela adição de AMPC exógeno (Xu *et al.*, 1997). Mitchell & Dean (1995) também evidenciaram o importante papel de *cpkA* dependente de AMPC na morfogênese relacionada a patogênese deste fitopatógeno. As fosfodiesterases dependentes de AMPC (PDEases) atuam no balanço dos níveis AMPC intracelulares, requerido para a morfogênese relacionada infecção em *M. oryzae*. Estudos funcionais das fosfodiesterases PedL e PedH de *M. oryzae* homólogas a Ped1e Ped2 de *S. cerevisiae*, respectivamente, evidenciaram que PDEH regula processos envolvidos em estágios tardios do desenvolvimento do apressório como geração de turgor e formação de poro. Enquanto que PEDL é

necessária para o desenvolvimento sexual e morfologia do conídio, e ainda esta proteína desempenha um papel menos evidente na regulação de AMPc (Zhang *et al.*, 2011).

As proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) estão envolvidas em cascatas de uma variedade de sinais extracelulares que atuam sobre a regulação do crescimento e processos de diferenciação celular. Geralmente esta via de sinalização contém três proteínas quinases que atuam em série: uma MAP quinase quinase quinase (MAPKKK ou MEKK), uma MAP quinase quinase (MAPKK ou MEK) e uma MAP quinase (MAPK). Quando a cascata é ativada, a MEKK fosforila a MEK, que por sua vez fosforila a MAPK. As cascatas de MAPK são encontradas em animais, plantas e fungos, muitas vezes regulam fatores de transcrição por fosforilação mediada por MAPK (Gustin *et al.*, 1998). Em *S. cerevisiae* cinco genes que codificam MAP quinases regulam a diferenciação sexuada, crescimento dimórfico (filamentoso), resposta a osmolaridade, integridade celular, e formação de ascósporos (Gustin *et al.*, 1998, Dohlman, 2002). No fitopatógeno *M. grisea*, diversas MAPK têm sido descritas, dentre elas: a PMK1 (regula a formação do apressório e a patogenicidade do fungo), MSP1 (essencial para a esporulação e a penetração) e a OSM1 (envolvida na regulação osmótica) (Xu, 2000). Liu *et al.*, (2011) demonstraram o papel de genes que codificam proteínas sensoras, na formação do apressório do fitopatógeno, em diferentes superfícies artificiais hidrofóbicas e hidrofílicas. Neste estudo, um duplo mutante $\Delta MoSho1 MoMsb2$ (SHO1 – codifica uma proteína sensora de membrana e MSB2 – codifica uma proteína mucina de superfície) raramente formou apressório em superfícies hidrofóbicas com nível reduzido de fosforilação da Pmk1 (proteína quinase ativada por mitógenos) e não foi responsivo a monômeros de cutina. Entretanto, em superfícies hidrofílicas, como ceras da superfície da folha e álcoois primários, o duplo mutante apresentou maior eficiência na formação do apressório quando comparado a linhagem mutante $\Delta MoMsb2$. Estes dados sugerem que *MoMsb2* e *MoSho1* têm uma redundância de funções no reconhecimento de sinais em superfícies diferentes para a ativação de Pmk1 e formação de apressórios. Enquanto que *MoMsb2* é crítico para a detecção de superfícies hidrofóbicas e monômeros de cutina, *MoSho1* pode

desempenhar um papel mais importante no reconhecimento de ceras de superfície de folhas.

PMK1 (MAP quinase 1 para patogenicidade) é uma proteína homóloga a FUS3/KSS1 de levedura, que é sequencialmente ativada pela MAPK quinase MST11 (MEK), e pela MAP quinase MST7 (MEKK) em *M. grisea*. Linhagens mutantes $\Delta pmk1$ reconhecem e respondem ao estímulo de superfícies hidrofóbicas ou a presença de AMPc exógeno, no entanto, foram incapazes de formar apressório e causar patogenia na planta-hospedeira. Da mesma forma, linhagens mutantes $\Delta mst7$ e $\Delta mst11$ demonstraram incapacidade para formar apressório e colonizar tecidos foliares. Assim, os autores evidenciam que MAPK é essencial para a formação do apressório e para o crescimento invasivo de *M. grisea* (Zhao *et al.*, 2005).

A MAP quinase MST11 apresenta um domínio N-terminal (SAM) que interage com a proteína MST50 que também possui este domínio. Linhagens mutantes $\Delta mst50$ foram incapazes de formar apressório e interagir com MST11. Isto sugere que a interação entre Mst50 e Mst11 é mediada pelo domínio SAM, pois Pmk1 não é fosforilada nas linhagens mutantes e que Mts50 opera a montante de Mst7. Apesar de Mst50 interagir também com as outras proteínas (Ras1, Ras2, Cdc42 e Mgb1), para regular o desenvolvimento do apressório, estudos funcionais demonstraram que as proteínas Ras provavelmente apresentam função a montante da cascata MAPK Mst11-Mst7-Pmk1 (Park *et al.*, 2006, Wilson & Talbot, 2009).

Também foram isoladas e caracterizadas proteínas homólogas a Pmk1 MAPK com funções na formação do apressório, dos fitopatógenos *Colletotrichum lagenarium*, *Cochliobolus heterostrophus* e *Pyrenophora teres* (Lev *et al.*, 1999, Ruiz-Roldán *et al.*, 2001, Takano *et al.*, 2001, Kojima *et al.*, 2002). A ativação à montante de Pmk1 MAPK é mediada pela via de sinalização da proteína G heterotrimérica em resposta a estímulos físicos, de superfícies foliares, como rigidez e hidrofobicidade. A subunidade β da proteína G, codificada pelo gene *MGB1*, é essencial para o desenvolvimento do apressório e para interagir fisicamente com a proteína Mst50 (Nishimura *et al.*, 2003). Em *M. oryzae*, um regulador da proteína G sinalizadora, Rgs1 interage com três subunidades α da

proteína G, MagA, MagB e MagC. Rgs1 interage ativamente com a forma GTP ativada de MagA durante o início da formação de apressório, regulando negativamente a atividade de GTP-MagA dependente de adenilato ciclase. Consistente com isto, linhagens mutantes $\Delta rgs1$ apresentaram um acúmulo de elevados níveis de AMPc. A disrupção de MagA ou MagC não apresentou efeito na formação do apressório ou patogenicidade, porém em MagB reduziu a conidiação, a formação do apressório e a virulência. Os autores sugerem que MagB é necessária para suprimir a formação do apressório em superfícies não indutoras, bem como regular negativamente a adenilato ciclase (Liu *et al.*, 2007). Nishimura *et al.*, (2003) demonstraram em linhagens mutantes, que a deleção da subunidade β da proteína G (codificada pelo gene *Mgb1*) afetou a formação do apressório, penetração e crescimento infeccioso. Entretanto, pela adição de AMPc, os mutantes $\Delta Mgb1$ formaram apressório. Dessa forma, *MGB1* pode estar envolvida na sinalização de AMPc para a regulação da conidiação, reconhecimento de superfície, e formação de apressório.

O receptor acoplado a proteína G codificado pelo gene *PTH11* parece ser necessário para o reconhecimento de superfícies hidrofóbicas no desenvolvimento de apressórios. Estudos funcionais, usando linhagens mutantes $\Delta Pth11$ de *M. grisea*, mostraram defeitos na formação do apressório e ausência de patogenicidade. Estes mutantes foram capazes de formar apressórios com uma frequência de 10 a 15% quando comparados ao selvagem. Dessa maneira, é evidenciado que vias de sinalização múltiplas medeiam diferenciação do apressório, pois *Pth11* pode ativar a diferenciação de apressórios em resposta a estímulos de superfícies indutoras e reprimir a diferenciação em superfícies pouco indutoras (DeZwaan *et al.*, 1999).

Li *et al.*, (2010b) caracterizaram funcionalmente um novo gene em *M. oryzae* relacionado à patogenicidade, *MoRIC8*, que codifica uma proteína homóloga a proteína reguladora Ric8, ligada a GTP, da proteína G sinalizadora. Neste estudo, foi evidenciada a interação direta de MoRic8 com a subunidade α MagB da proteína G, no entanto nenhuma interação física foi detectada com as outras proteínas G (MagA, MagC, Mgb1 e Mgg1). E esta proteína parece atuar à montante da via em resposta a AMPc, que é necessária para a morfogênese do

apressório. Além disso, mutantes nocautes foram não-patogênicos e defectivos na diferenciação celular associada à formação do apressório, esporulação, desenvolvimento sexual e infecção. Na Figura 4, é apresentado um esquema das possíveis vias de sinalização envolvidas na diferenciação do apressório em *M. oryzae* elaborado por Wilson & Talbot (2009).

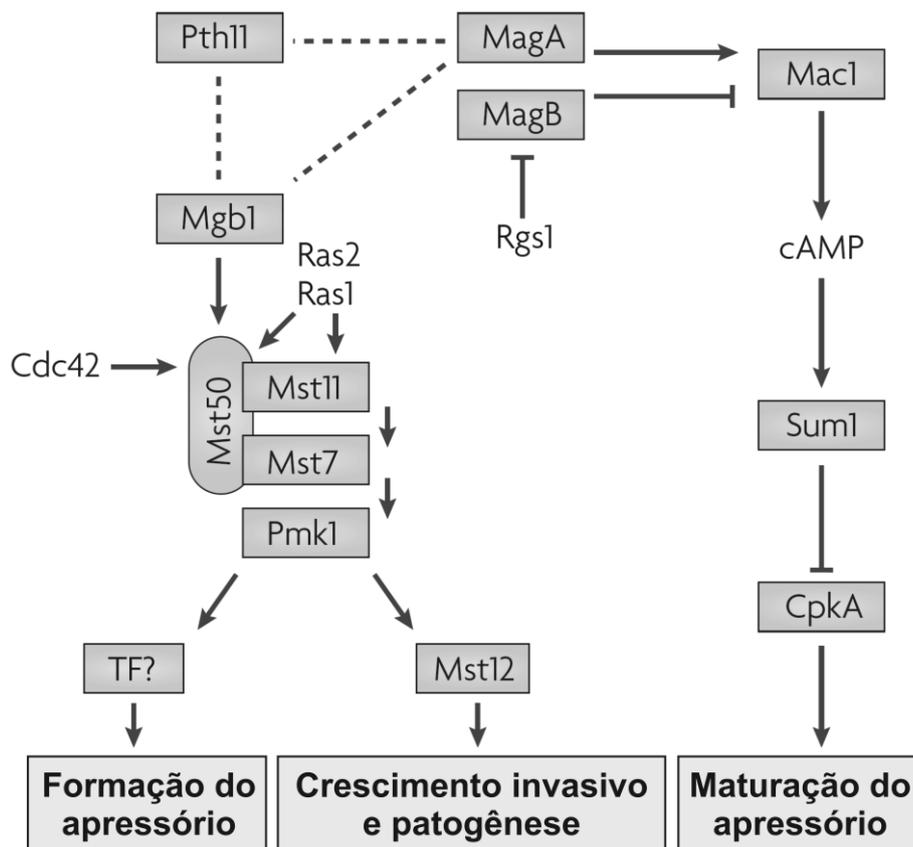


Figura 4 – Vias de transdução de sinal necessárias para o desenvolvimento morfológico relacionado à patogenicidade de *M. oryzae* (esquema modificado de Wilson & Talbot 2009) .

3.1.3. Apressório em fungos entomopatógenos

Diversas espécies de fungos entomopatogênicos têm a capacidade de diferenciar apressório, dentre elas: *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus parasiticus*, *Paecilomyces farinosus*, *Coelomomyces psorophorae*, *Neozygites fresenii*, *Alternaria alternata* entre outras (St Leger *et al.*, 1989, Xavier-Santos *et al.*, 1999, Hatzipapas *et al.*, 2002, Gökçe & Kubilay, 2005, Talaei-hassanloui *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* relacionados à fisiologia da diferenciação do apressório de *M. anisopliae* têm demonstrado a indução desta diferenciação através de estímulos de superfícies rígidas e hidrofóbicas em presença de baixas concentrações de compostos nitrogenados (St Leger *et al.*, 1989). No entanto, a formação do apressório pode variar de acordo com a linhagem do fungo, como verificado por Carvalho (2009) em que as condições utilizadas por St Leger *et al.*, (1989) não apresentaram os mesmos resultados quando reproduzidas com a linhagem E6 de *M. anisopliae*.

Alguns genes associados aos mecanismos dos estágios iniciais da penetração por *M. anisopliae* em seus hospedeiros têm sido elucidados, porém, estudos relacionados a mecanismos do ciclo celular e de sensoriamento que regulam a formação do apressório ainda são limitados.

O silenciamento do gene *Mos1* (codifica uma proteína osmosensora de *Metarhizium*), resultou em linhagens mutantes com maior sensibilidade ao estresse osmótico e oxidativo, deficiência na biossíntese de parede celular, atraso na germinação dos conídios, alterações defectivas na formação de apressórios e corpos hifais e também virulência reduzida quando comparadas ao tipo selvagem. Além disso, as linhagens *Mos1*-antisense apresentaram alterações na expressão de um conjunto de genes, que são regulados positivamente em ambientes com alta pressão osmótica, tais como, *Mad1*, *So*, *Mpl1* e *Hsp70* (Wang *et al.*, 2008). A redução dos níveis transcricionais de *Mad1* (adesina envolvida na germinação de conídios e diferenciação de corpos hifais) em mutantes *Mos1*-antisense pode explicar, em parte, o atraso da germinação e a formação de corpos hifais multicelulares ramificados (Wang *et al.*, 2008). Isto também foi observado em mutantes nulo de *Mad1* (Wang & St Leger, 2007a). Em leveduras, a oxidase C4-

metil esterol (codificada pelo gene *So*) parece ser um componente importante na biossíntese do ergosterol, sendo responsável pela permeabilidade e rigidez da membrana celular (Bard *et al.*, 1996). Em linhagens *Mos1*-antisense de *M. anisopliae* foi evidenciada a diminuição da expressão deste gene (*So*) que afetou a capacidade de controle da permeabilidade e da rigidez da membrana celular (Wang *et al.*, 2008).

Os níveis da proteína pirilipina (MPL1, responsável pela formação de gotículas de lipídios) controlam a pressão de turgor e a diferenciação do apressório de *M. anisopliae* pelo metabolismo de triacilgliceróis e conseqüente produção de glicerol. Estudos funcionais demonstram que a geração de turgor em mutantes $\Delta Mpl1$ é dramaticamente reduzida evidenciando que as gotículas de lipídios são necessárias para o acúmulo de solutos na célula (Wang & St Leger, 2007b). A expressão de *Mpl1* é geralmente regulada negativamente em linhagens selvagens frente a altas pressões osmóticas, que permitem o acúmulo de glicerol na célula, aumentando a pressão osmótica intracelular. Contrariamente, *Mpl1* foi positivamente regulada após a supressão por RNAi de *Mos1*, indicando uma capacidade reduzida de aumentar a pressão osmótica intracelular em resposta ao estresse osmótico (Wang *et al.*, 2008). Ainda, a redução nos níveis transcricionais de *Hsp70* (proteína de choque térmico) em linhagens silenciadas para *Mos1*, é indicativo de uma diminuição geral da resposta ao estresse osmótico e oxidativo.

Linhagens nocaute de *M. anisopliae* para a subunidade catalítica da proteína quinase 1, codificada por *Mapka1*, apresentaram danos na formação do apressório e diminuída virulência ao hospedeiro *Galleria mellonella*. Análises transcriptômicas, comparando *M. anisopliae* tipo selvagem com o mutante $\Delta mpka1$, demonstraram que PKA é responsável por regular positivamente cerca de um terço dos genes induzidos por cutículas de insetos. E isto inclui genes responsáveis pela diferenciação do apressório e pela formação de grampos de penetração, enzimas de degradação de cutícula, aquisição de nutrientes, regulação de pH, síntese de lipídeos, controle do ciclo celular e citoesqueleto (Fang *et al.*, 2009).

A lacase de classe 1, (MLAC1) está envolvida tanto na virulência, quanto na tolerância à estresses ambientais em *M. anisopliae*. *Mlac1* é expresso durante

crescimento isotrópico (propágulos) e não durante crescimento polarizado (tubos germinativos e hifas). Entretanto, durante processos de infecção também foi evidenciada a expressão de *Mlac1* em estruturas de infecção como apressório. A disrupção deste gene reduziu a virulência do fungo frente ao hospedeiro (*Galleria mellonella*) devido à formação de apressórios defectivos e atraso em eventos pós-infecção. Além disso, as linhagens mutantes $\Delta Mlac1$ produziram conídios amarelos com susceptibilidade aumentada ao estresse por choque térmico e UV-B (Fang *et al.*, 2010).

Apesar de diversos genes já descritos no envolvimento da formação do apressório, pouco se sabe sobre o papel de quitinases na diferenciação desta estrutura de penetração. Entretanto, foi evidenciada a participação de uma endoquitinase (CHI2) em processos de penetração de *M. anisopliae*. Através de análises por imunofluorescência foram observadas diferenças marcantes na distribuição da enzima CHI2 em diferentes tipos celulares. Em hifas diferenciadas em apressório da linhagem selvagem, esta proteína encontra-se associada à germinação, no ápice da hifa, no ponto de formação do apressório e em toda a estrutura do apressório. Isto fortalece a hipótese de uma especialização de diferentes quitinases em *Metarhizium* (Boldo *et al.*, 2009).

3.1.4. Proteínas de matriz extracelular ancoradas por GPI

A parede celular em fungos é uma estrutura dinâmica de interação com o meio externo, que fornece resistência mecânica suficiente para proteger a integridade da célula frente a variações de pressão osmótica no ambiente. Além disso, a parede celular fornece permeabilidade celular e plasticidade adequada para permitir o crescimento das células, a divisão celular e a diferenciação de diversos tipos celulares durante o ciclo de vida do fungo (Bowman & Free, 2006). Para a maioria dos fungos, a parede celular, é composta por β -1,3 e β -1,6 glicana ligada à quitina via ligação β -1,4. Estão também presentes polissacarídeos e peptidopolissacarídeos, que atuam como compostos imunologicamente ativos com grande potencial na patogênese e na resposta imune frente ao hospedeiro.

A camada mais externa da parede celular é composta principalmente por glicoproteínas ou proteínas de matriz extracelular, que são covalentemente

ligadas a 1,6 glicana através do ancoramento a GPI. Entretanto, a 1,6 glicana pode ainda ser ligada a 1,3 glicana ou quitina, resultando em uma forte ligação covalente entre GPI e proteínas de parede celular à parede celular do fungo (De Groot *et al.*, 2005). As proteínas GPI são conservadas entre eucariotos e apresentam funções múltiplas que promovem a adesão celular, a transdução de sinais intracelulares a partir de estímulos externos, a síntese e o remodelamento de componentes da parede celular (Bowman & Free, 2006, Latgé, 2007). E estas proteínas são originadas de precursores, sintetizados a partir de sequências contendo uma sequência sinal N-terminal hidrofóbica conservada (direciona a proteína para o lúmen do retículo endoplasmático); e uma região hidrofóbica na porção C-terminal (direciona a adição de GPI), precedida por três aminoácidos denominados ω , $\omega+1$, $\omega+2$ (Gerber *et al.*, 1992).

O sinal de ancoramento a GPI consiste de uma porção hidrofóbica C-terminal, separada do sítio de clivagem/ligação a GPI (sítio ω), por uma porção espaçadora curta hidrofílica (Pittet & Conzelmann, 2007, Mayor & Riezman, 2004). Este sítio é normalmente ocupado por resíduos de asparagina, glicina ou serina, no entanto, há uma menor afinidade em relação a outros aminoácidos. Após a adição do sinal GPI nos sítios ω na proteína, esta é então translocada para a membrana plasmática, pela via de secreção, e liberada para ligar-se covalentemente a β -1,6-glicana da parede celular. Além disso, essas proteínas se caracterizam por apresentarem porções ricas em serina e treonina (sítios de O-glicosilação e N-glicosilação), que são incorporadas na matriz extracelular ou folheto lumenal de membranas através de suas porções glicolípídicas. Isto fornece um dobramento correto, estabilidade e uma correta exposição do domínio N-terminal da proteína (Lu *et al.*, 1995, Mayor & Riezman, 2004).

Com o propósito de investigar a estrutura e composição da parede celular de *Fusarium oxysporum*, Schoffemeer *et al.*, (1999) identificaram a primeira glicoproteína de parede celular em fungos filamentosos. A partir destes estudos, Schoffemeer *et al.*, (2001) clonaram e caracterizaram uma glicoproteína covalentemente ligada à parede celular de *F. oxysporum*. Esta proteína de 212 aminoácidos, designada como FEM1 (*Fusarium oxysporum extracellular matrix protein*) apresentou características típicas de uma proteína de matriz extracelular

ou glicoproteína, tais como: 17 aminoácidos na porção N-terminal como sequência sinalizadora para secreção, dois potenciais sítios de N-glicosilação, alta porcentagem (29%) de resíduos de serina e treonina e 22 aminoácidos na porção terminal com características de sinais de adição de âncoras de GPI. Em análises comparativas de sequências, a proteína FEM1 apresentou homologia a outros fungos filamentosos incluindo *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, e *Metarhizium anisopliae*. Além disso, estes autores demonstraram através de análises funcionais em mutante FEM1 com a sequência sinal de ancoramento a GPI deletada, que a proteína não é retida na parede celular fúngica, pois esta foi detectada no meio de cultivo.

Posteriormente, Ahn *et al.*, (2004) isolaram e caracterizaram a proteína EMP1 de *M. grisea* (homóloga a FEM1). A proteína apresentou 207 aminoácidos, uma sequência sinal de secreção contendo 18 aminoácidos na porção N-terminal, quatro potenciais sítios de N-glicosilação, e 16 aminoácidos na porção C-terminal com características sinalizadoras de adição de GPI. A deleção deste gene (*emp1*) resultou na redução da patogenicidade e de diferenciação a apressório, não afetando o crescimento do micélio e capacidade de conidiação do mutante. Esses dados sugerem um papel importante para *emp1* no sensoriamento de sinais da superfície hospedeira e/ou transmissão de sinais na célula para promover a adesão do conídio e diferenciação do apressório de *M. grisea*.

Carvalho (2009) isolou e caracterizou uma ORF de 678pb correspondendo a uma proteína putativa de 266 aminoácidos, que provavelmente corresponde ao gene *emp1* de *M. anisopliae*. De acordo com análises *in silico*, esta proteína apresentou características típicas de proteínas de matriz extracelular ancoradas por GPI (Figura 5). Além disso, foi evidenciada uma homologia de 40% da proteína predita Emp1 de *M. anisopliae* com as proteínas ortólogas Fem1 de *Fusarium oxysporum* (Schoffemeer *et al.*, 2001), Emp1 de *Magnaporthe grisea* (Ahn *et al.*, 2004) e com uma sequência (CAE76327) de *Neurospora crassa*. Apesar destas análises *in silico* indicarem um possível gene que codifica uma proteína de matriz extracelular, estudos funcionais são necessários para entendermos o papel de *emp1* no processo de infecção de *M. anisopliae*.

```

1 GCTTAGCCTACATTGGTCTCGCACGGTTTTAGAACCCACCCCTAGCTTGGGTAAAGGCAG 60

61 CTGCGTAGTTGCTCTTGCCACTTCGTTTAGGCGAGCCAACTGGCAGCTCCAAGTGCTCGT 120

121 ATTTCTGCGGCCAATCGACATTGGCGACATTGGCAACATTTAAAGCTGGCTTGGCGTTT 180

181 GACTCGTCTGCTACGAATAAATCCAAGACAGGGCCGATGACATTGATGCAAAGATCTTC 240

241 TTGCTGACTAGCGTTTTGTTTGACAGTTTGACACTTCACAGTCATTGCGCAGATTACCGT 300

301 TTTTCGAAatgaagtacgctctcgttatttcagctttggctgctctggccgcccgcgcg 360
1 M K Y A L V I S A L A A L A A A A E 18

361 aaaagcccaagtctcctcaacagcaacttccagattaccgagggccagtcattcggatctca 420
19 K P K F L N S N F Q I T E G Q S F D L K 38

421 agttcgacggctgtgagggcggtgcaccatcactcttcaggacggtcccaataccaacc 480
39 F D G C E G G C T I T L Q D G P N T N L 58

481 ttaaggactacaaggttatttccaGTAAGTTTGCAATCCATGCCTGAGCAGATGTGTTGA 540
59 K D Y K V I S 65

541 ACTTGATGCTAACATCCCTCGTAgctagcgcgaccggcggttctctcgcctgggtcccg 600
66 T S A T G G S L A W V P E 78

601 agggcggtgtttctggcacctatgccttcaagatccaacaacaagcgaaggagtaca 660
79 G V V S G T Y A F K I T N N A N K E Y N 98

661 actattctcaacagttctcctacctcggcactggagctagcgtcacggcttctgcccga 720
99 Y S Q Q F S Y L G T G A S V T A S A A S 118

721 gcaagactggctcttcgaccggctccgctactgctactgctactgcttctctactgagg 780
119 T T G S S T G S A T A T A T A S S T E A 138

781 cgtcttcactgtcagcatcactgagcagcagcagagctctactgagagcggaaaccg 840
139 S S T V S I T A S S T E S S T E S G T A 158

841 cgagcaccaccatttctaccgtcaccagctctgccaccagggccagcggctcttccacca 900
159 S T T I S T V T S S A T T A S G S S T T 178

901 ctctgccccctctctccggaactGTGAGCAAAACACTTTTGATCTAAAATCAGACGAG 960
179 S P P S S A T 185

961 AATTATCCGCTAACACCTTCTACGCAGcccatcactcttccaccagatctaccacc 1020
186 S H S S T S T R S T T 196

1021 ggcgccaccaccactgttcccaacgctgtgtccgcccactcccattggctttcgttga 1080
197 A A T T T V P N A G V R A T P M A F V A 216

1081 ggccggttgccgctctcgttatctcgtttaa 1113
217 G A V A A L A Y L G * 226

```

Figura 5 - Sequência de nucleotídeos e da proteína predita Emp1 de *Metarhizium anisopliae*. A sequência deduzida da proteína está representada abaixo da sequência de DNA. Os íntrons estão marcados em cinza. O potencial peptídeo sinal correspondente a 16 aminoácidos hidrofóbicos na porção N-terminal está marcado por um retângulo pontilhado ao redor da sequência. O potencial sítio de glicosilação está marcado com uma linha grossa abaixo da sequência. O sinal de adição de GPI sequência está marcado com um retângulo ao redor da sequência e a parte hidrofóbica do motivo está marcada por uma linha fina abaixo da sequência (Carvalho, 2009).

3.2. OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo avaliar a possível função do gene *emp1* pela análise transcricional deste gene nos estágios de diferenciação celular de apressório, crescimento vegetativo, e blastosporos; e pela construção de uma linhagem de *M. anisopliae* inativada para este gene.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Material biológico

3.3.1.1. Linhagem de *Metarhizium anisopliae*

O fungo filamentosso entomopatogênico *M. anisopliae* var. *anisopliae*, isolado E6, isolado de *Deios flavopicta* (Hemoptera, Cercopidea) no Estado do Espírito Santo, cedida pelo professor João Lúcio de Azevedo (Coleção da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz - ESALQ - USP), foi utilizado neste trabalho. Sua manutenção foi realizada em Meio de Cove completo (MCc) em placas de Petri a 28°C.

3.3.1.2. Linhagem de *Escherichia coli*

Foram utilizadas as linhagens TG2 e XL1Blue de *Escherichia coli* preparadas para eletrocompetência, e utilizadas nas eletroporações como hospedeiras de vetores pUC18. A manutenção das células foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) líquido conforme previamente descrito (Sambrook & Russell, 2001).

3.3.1.3. Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

A linhagem e o vetor binário de *A. tumefaciens* utilizados nos experimentos de agrotransformação são EHA105 e pPZP201BK, respectivamente. As células foram preparadas para quimiocompetência de acordo com protocolo previamente descrito (Holsters *et al.*, 1978).

3.3.2. Meios de cultivo

3.3.2.1. Manutenção e manipulação de *M. anisopliae*

Os meios de cultivo utilizados para a manutenção do fungo *M. anisopliae* foram: Meio de Cove (MC) [Nitrato de sódio 0,6%, Glicose 1%, pH 7,0] e Meio de Cove Completo (MCC) [Nitrato de sódio 0,6%, Glicose 1%, casaminoácidos 0,15%, Extrato de levedura 0,05%, peptona 0,2%, pH 7,0]. São acrescidos 2% de Solução de Sais [KCl 2%, MgSO₄.7H₂O 2,6%, KH₂PO₄ 7,6%] e 0,04% de Solução de Elementos [Na₂B₄O₇.7H₂O 0,004%, CuSO₄.5H₂O 0,04%, FeSO₄ 0,001%, Na₂MnO₄.2H₂O 0,08%, MnSO₄.7H₂O 0,08%, ZnSO₄.7H₂O 0,08% (m/v)]. Para meios de cultivos sólidos foi adicionado 1,5% de Agar.

Para efetuar as suspensões, os esporos de *M. anisopliae* foram coletados (com uma alça de Drigalski e 10 mL de solução de Tween 80 0,001%) a partir de culturas em placas de Petry em meio MCC sólido incubadas a 28°C por sete dias. A suspensão obtida foi lavada duas vezes com água destilada estéril e centrifugada (5.000 g durante 10 min). Os esporos foram ressuspensos em água destilada estéril e contados em Câmara de Neubauer. As suspensões foram estocadas a 4°C e utilizadas por no máximo duas semanas.

3.3.2.2. Manutenção e manipulação de *E. coli*

Inóculos de *E. coli* foram realizados em meio de cultivo Luria – Bertani (LB) [triptona 1%, extrato de levedura 5%, NaCl 1% (p/v), pH 7,0]. E para efetuar as eletroporações, foi utilizado o meio SOC [triptona 1%, extrato de levedura 5%, NaCl 1% e glicose 20mM (p/v)]. Os meios sólidos foram acrescidos 1,5% de ágar. Todas as culturas foram mantidas a 37°C.

3.3.3. Manipulação de ácidos nucléicos

A extração de DNA de *Metarhizium* foi executada de acordo com protocolo estabelecido por Nakazato (2005). Para realizar a extração de DNA de esporos em forno de microondas, uma alçada de esporos de *M. anisopliae* foi retiradas de placas esporuladas, e adicionada em tubos Eppendorf contendo 100µL de água

miliQ. Após permanecer por 10 minutos, sob fervura, no forno de microondas em potência máxima, os tubos foram centrifugados a 14.000 g por 10 minutos e o sobrenadante removido para novos tubos. Após nova centrifugação, 5µL do sobrenadante foram utilizados como molde para a reação de PCR. Esta metodologia teve como base a descrita por Ferreira & Glass (1996). A extração de DNA plasmidial de *E. coli* foi executada por lise alcalina de acordo com Sambrook & Russel (2001).

3.3.4. Soluções e enzimas utilizadas

As soluções e tampões foram preparados conforme Sambrook & Russel (2001) utilizando água destilada ou água miliQ autoclavadas. As enzimas de restrição e de modificação foram obtidas a partir de CenBiot Enzimas, *Fermentas*, *New England BioLabs* e *Invitrogen*.

3.3.5. Otimização da indução *in vitro* de apressório e blastosporos

Para a otimização das condições de diferenciação celular *in vitro* de *M. anisopliae* foram realizados os seguintes procedimentos:

3.3.5.1. Condições experimentais *in vitro* para indução de apressório

Para induzir a formação de apressório, 5×10^5 conídeos. ml⁻¹ de *Metarhizium* foram inoculados em placas de Petry contendo 20 lamínulas de vidro redondas por placa, embebidas em 20 mL de meio líquido contendo 0,004% de extrato de levedura. As placas foram incubadas a 28°C, sem agitação, por 12 e 16 horas de cultivo (Figura 8). Os testes foram efetuados em duplicatas para cada tempo de cultivo. Após a otimização, o melhor tempo de cultivo, do qual induziu um maior número de apressórios, foi utilizado como parâmetro para reproduzir o experimento em escala maior, e posterior obtenção de RNA total de apressórios. O rendimento de apressórios foi determinado pela razão entre o número de esporos diferenciados em apressório e o total de esporos germinados.

3.3.5.2. Condições experimentais *in vitro* para indução de blastosporos

Para a otimização de condições experimentais indutoras da diferenciação celular em blastosporos, foi utilizado um inóculo inicial de 5×10^4 conidia.mL⁻¹ em 100 mL de meio de cultivo ADAMEK [3% *Corn Steep solids*, 4% glicose, 3% extrato de levedura (p/v), pH 7,0] em frasco erlenmeyer (500mL) (Ypsilos & Magan, 2004). Posteriormente, o experimento foi incubado a 28°C sob agitação de 180 rpm. Para avaliar a produção ótima de blastosporos, alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos de cultivo 16, 24, 30, 36, 48 e 64 horas e observadas por microscopia óptica (Figura 9). O rendimento de blastosporos foi estimado pela contagem em hemocitômetro. Os cultivos foram feitos em duplicata. As hifas produzidas por *M. anisopliae* antes da produção de blastosporos foram utilizadas como uma condição intermediária. Após a otimização das condições indutoras de blastosporos, o tempo de cultivo com melhor indução foi utilizado para a execução de experimentos em maior escala com a finalidade de obter RNA total para os experimentos de RT-PCR.

3.3.6. Preparação e armazenamento dos tipos celulares de *M. anisopliae*

Antes da extração de RNA total de apressório, 500 lamínulas contendo apressórios foram lavadas com água DEPC, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. As culturas contendo células fúngicas com crescimento vegetativo foram filtradas em papel Whatman No.1, lavadas com água DEPC, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Os blastosporos foram coletados através da filtração com lã de vidro para remover todas as hifas, e o sobrenadante contendo somente blastosporos foi centrifugado a 7000g por 10 minutos e lavado com água DEPC por três vezes. Estes foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Todos os experimentos de diferenciação celular foram avaliados por microscopia óptica como demonstrado nas Figuras 8 e 9.

3.3.7. Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagent Trizol de acordo com recomendações do fabricante. Os seguintes controles foram realizados em paralelo com cada condição de cultivo. Para assegurar a ausência de DNA genômico, o RNA total foi tratado com DNase I e avaliado por PCR (reação de controle negativo). Com aproximadamente 1µg de RNA total oriundo de cada tipo celular, foi efetuada a transcrição reversa usando SMART cDNA Syntesis Kit (Clontech), de acordo com as recomendações do fabricante. E para os ensaios de RT-PCR, a expressão do gene beta-tubulina foi utilizada como controle (reação de controle positivo).

3.3.8. Análise transcricional do gene *emp1* de *M. anisopliae*

A partir do cDNA oriundo dos diferentes tipos celulares (apressório, crescimento vegetativo e blastosporos) foram realizadas reações de PCR, utilizando primers que flanqueiam regiões de éxons - *emp1* RT F e *emp1* RT R (Tabela 3), para a amplificação de transcritos do gene *emp1*.

3.3.9. Construção do cassete de inativação para o gene *emp1* de *M. anisopliae*

As sequências referente a região 5' e 3' flanqueadoras do gene *emp1* foram obtidas a partir da elaboração de oligonucleotídeos contendo sítios de clivagem para as enzimas de restrição EcoRI, HindIII e PstI (Tabela 3).

Para a construção do cassete de inativação do gene *emp1* (pPZP::*bar*::*emp1*) foi efetuada a amplificação das porções 5' flanqueadora (1513 pb) e 3' flanqueadora (1515pb) do gene (Figura 6) e da marca de seleção (cassete de expressão do gene *bar* - 3648 pb) (Staats *et al.*, 2007). Os fragmentos das porções 5' e 3' amplificados por PCR foram purificados a partir de gel de agarose com o Kit de purificação de ácidos nucléicos GFX (GE) em seguida tratados com as enzimas Klenow e T4PNK, clonado no sítio Smal do vetor pUC18. As porções 5' e 3' foram confirmadas por sequenciamento e clivagem. Após a confirmação da sequência o vetor pUC18::5' foi clivado com as

enzimas de restrição PstI e EcoRI para liberação da banda correspondente a porção 5' flanqueadora de *emp1* que foi subsequentemente clonada no vetor binário pPZP201BK. O vetor pPZP201BK::5' foi clivado nos sítios de restrição PstI e HindIII para a inserção da porção 3' flanqueadora do gene *emp1* liberada previamente de pUC18:3', nos mesmos sítios de restrição, resultando em um vetor com as duas porções flanqueadoras do gene *emp1* clonadas no vetor pPZP201BK. O vetor pPZP201BK::5':3' foi clivado no sítio de restrição PstI, em seguida tratado com a enzima SAP (desfosforilação) para não haver recircularização. Neste sítio (PstI) foi inserido o cassete do gene *bar* (3,5Kb) (Figura 7). Este gene codifica uma fosfotricina acetiltransferase que confere resistência ao antibiótico glifosinato de amônio (Thompson *et al.*, 1987); e permite a seleção de transformantes de *M. anisopliae* em meio contendo 250 µg.mL⁻¹. Todas as ligações foram transformadas em células de *E. coli* XL1Blue ou TG2 por eletroporação. O vetor construído pPZP::bar::emp1 (13,65Kb) foi transformado por choque térmico em células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados na construção do cassete pPZP::bar::emp1, na seleção de transformantes e na análise transcricional de emp1.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' - 3'
dmaemp1 5'F	gaa ttc gga acc att ttc agg ctg gtc
dmaemp1 5'R	ctg cag tgg aag ttg ctg ttg agg aac
dmaemp1 3'F	ctg cag tta acc ctc gct cac gaa taa AC
dmaemp1 3'R	aag ctt gat ggt CGT CGC cga tgc cac
BarF	cca tgg cca tga gcc cag aac gac
BarR	gag taa aga aga gga gca tg
tubF	cat ctc tgg tga aca cgg c
tubR	agt tgt cgg gac gga aaa g
emp1 RT F	atg aag tac gct ctc gtt att tca g
emp1 RT R	aga taa gcg aga gcc gca acg gcg c

```

1   gagttgaaattgtcctcctcctcctcgctcgagtgctattatgtacaaagatggcgcgactcgtccggcgaggaatcgactgcaggtggaaccattttcaggct 100
101 ggtcagtatcggcagcaataatgaatcatgctggcttagcgaatgtgacactgcgcgtaactgcactcgctcatgtatgatacaacacacatggagg 200
201 aggagtagctgcatggttcgcctgcacctggcatgagacatgagaggtcacaatgctgacagagccttgacctgctcgtcgcaacttgcctgctgtgtcct 300
301 tccgccatgtgtgaaacgacctacgtgttctcttccctattatacccgctacacaggtagtaagagaagagattggggcgtattgcctcaccgctagt 400
401 tgcataacctgttcaaggcacaggactggatttctgggcttttaaatggagggtgtggaacgaaactagcctcggccgaggggcccttggctcgag 500
501 ctccgcttatcccgcaacaattaggacatgcccacaaacgaccaagcgcgcccatcggtttgcatcctaggggagaaggttccgagctaggccaag 600
601 aggctgtgcagctgtgagtggttctcggacctggaatgtgatgagttgaaagccacagaccaccgcatgacggggcctgagcagccacttgagcatggg 700
701 gtgaaagaaatttgcgcctatgcatgatgcatgggagctcggctcgaagtctgcttgggtgaggtgtgaaatctatttgaatccggggtgcgctca 800
801 tgcgtcttaatagaatcctgtcccccttactctcttgcacgctatatttttaactgcttctgcagcttgtaacctcgtttggccacgtccgctctg 900
901 agcaactcactcgtttgtcgtgaagtcttgacatcggctccttccctcgtttgacgttaccttcttttttggccgctcactcgtatgaacctcgtctaaaca 1000
1001 cgaataaccgcacaccaccggctcttctgtgaacctcggccattatttgaagtgtctattttgggggtggtcctgtggcgtccaaattccaact 1100
1101 atcgtcgtttgtcgtgattcagtcggaccggagccagaacctgcacactcgttctcctgagaccagcagagttttaaactcctgctctcagcttagc 1200
1201 ctacatttgctcgcagcggttttagaaccacaccctagcttgggtaaaggcagctgcgtagttgctcttggccactcgtttaggcgagcaactggcagc 1300
1301 tccaagtgtcgtatttctcggcgaatcgacatttggcgacatttggcaacattaaagctggcttgcgtttgactcgtctgctacgaataaatccaag 1400
1401 acaggggcccagatgacattgatgcaaatgctcttctgctgactagcgttttgggtgacagtttgacacactcaccagtcattcgcagattaccgcttttcca 1500
1501 aatgaagtacgctctcgttatttccagcttggctgctctggcgcgcgcgcaaaagcccaagttcctcaacagcaactccaagattaccgaggggccag 1600
1   :M.K.Y.A.L.V.....S.A.L.A.A.L.A.: A A A E K P K F L N S N F Q I T E G Q 33
1601 tcattcgatcctaagttcgcggctgtgagggcgctgcaccatcactcttcaggcaggtcccaataccaaccttaaggactacaaggttatttccagta 1700
34   S F D L K F D G C E G G C T I T L Q D G P N T N L K D Y K V I S 65
1701 agtttgcacatccatgctcagcagatgtgtttgaaacttgatgctaaacatcctcgtac 1800
66   T S A T G G S L A W V P E G 79
1801 tgtttctggcactatgcttcaagatcaccacaacgcaacaagagtagacaactatttctcaacagtttctcctcactcggcactggagctagcgtcaccg 1900
80   V V S G T Y A F K I T N N A N K E Y N Y S Q Q F S Y L G T G A S V T 113
1901 gcttctgcgcgacgactgctcttcgaccgctcgcctcactgctcactgcttactgcttctcctcactgagcgtcttccactgtcagcatcagctcgca 2000
114   A S A A S T T G S S T G S A T A T A T A S S T V E A S S T V S I T A 146
2001 gcagcacggagagctcactgagagcggaaaccgagcaccaccatttctaccgctcaccagctctgccaccacggccagcggctcttccaccacttcgcc 2100
147   S S T E S S T E S G T A S T T I S T V T S S A T T A S G S S T T S 179
2101 cccttctccgcgacttctgagcaaacacttttgatctaaatcagacgacgaattatccgctaaccacacttctacgca 2200
180   P P S S A T S H S S T S 191
2201 cagatctaccaccgcccaccaccactgttcccaacgctgggttccgcgccactcccattgcttctggtgagggcggcttccgctcctcgtctatctc 2300
192   T R S T T A A T T T V P N A G V R A T P M A F V A G A V A A L A Y L 225
2301 ggttaacctcgcctcagcaataaacgagatgggtatttggttttaaactgaggttatgtaattggacgcccacacttttttagtagttgataatccca 2400
226   G * 226
2401 gtcagcgtaatcgcttgaactcacttgagagcggggaggagcatcgagcatgaattgtcaatgtcgtttttcgttttacgctcaactgctgtcattg 2500
2501 cactgctatgattgctcgtacatgtatctcttagttctatgcatattgccagtaaggtataatacaaatctgtaaaaactggggccaattttgtcc 2600
2601 cttgccgatcttccatcaggtgaagaataggtttgttcaactgcatcagatacagtcactcgtcccaacttttcttccgatcagatgagtccttcccag 2700
2701 ggtcctctcccatcggaaagttaaactctggtagattgcccgctgccacgtagagcatgactgacttgatcaatgtcaaaataggagggaataaaaacaa 2800
2801 aagactgtggagtagcgtgtctaatactataacggcgctactcctgattcttttgcagtgctcaactggctgacgtttcactccacattatgaca 2900
2901 tctgcatgaacatggtaccctgggtgacgctacacgatcccttgggttaaacgctgcaactttacatggttgcgtgttggcggtgagatgcatcctccgct 3000
3001 gatgggtgagcgtattcaatgaagcacatcagcctgacgtggagtgcaccgcccgaaggacggctggcaataacgaaaaagaggaatgaaattac 3100
3101 actaaatagtagtactatggccaacgtaacgttgaatccaaatgaaacaaagtatcgcaaacatgtcttggtagacggcataaatgaagctcgaatggc 3200
3201 acgtcccttttccctgcctagaatataccctcactgctcttcccttccacatcccaagcattatgttatcccaggatcctggagcgtctgcaagtttgc 3300
3301 accgggtatatacagataaaggaaaaggacaagtaagaaaagaaagaaaagtaagacacagtgaaagccacaatccgtagggccagaccaaacca 3400
3401 aagccactcagggaagagatgatattgatgtttaaactgggttatccaggaagaaagcaaaaagaaaggggaaaaagaaagaaatagttaaatctg 3500
3501 ctactaaacaaactgtggatcgtttgagttatcgttacatcgtaaaacatggtaaacattgtcatcaagtttagaatgttcttgggtagttgtatgttg 3600
3601 gctctagcccagctcccccttccattgcccactgctccaacggcaaaagacatcgaactcataagagctgcagccttatcggggcccaagggtcaagatgttg 3700
3701 ttcaattcagcctgatgagactctcgcgtagcagcggagcatttcttggcactacctcggcggtattttggccgctcggcggtgagcagcggcagca 3800
3801 ccacattatcaccggcgccacaatgctggcagaagtgtgtttaaattatcgaagagttgaacgttgggtgcccgtcagttcctcgcgaggtccggagc 3900

```

Figura 6 – Sequência das regiões 5' e 3' flanqueadoras do gene *emp1* utilizadas na construção do cassete de inativação pZP::*bar*::*emp1*. A sequência deduzida da proteína está representada abaixo da sequência de DNA. As sequências das regiões 5' e 3' flanqueadoras do gene *emp1* estão marcadas em cinza-claro. Os íntrons estão marcados em cinza-escuro; O potencial peptídeo sinal na porção N-terminal está marcado por um retângulo pontilhado ao redor da sequência; O potencial sítio de glicosilação está marcado com uma linha grossa abaixo da sequência; O sinal de adição de GPI está marcado com um retângulo ao redor da sequência e a parte hidrofóbica do motivo está marcada por uma linha fina abaixo da sequência.

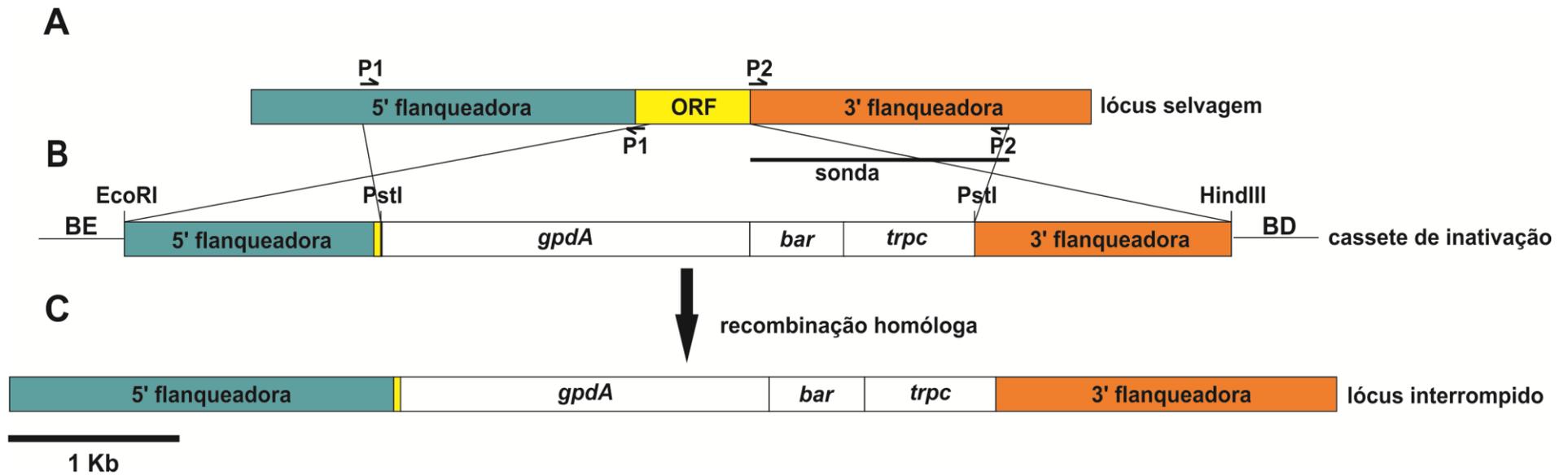


Figura 7 – Representação esquemática da inativação do gene *emp1*. No painel A está representado o *lócus selvagem* do gene *emp1*; no painel B, a montagem do *cassete de inativação* para o gene *emp1*; no painel C, a *recombinação homóloga* do *cassete de inativação* para o gene *emp1* no *lócus selvagem*. **P1**: Oligonucleotídeos [*dmaemp1_5'F* e *dmaemp1_5'R*] que amplificam a região 5' flanqueadora do gene [1513pb]; **P2**: Oligonucleotídeos [*dmaemp1_3'F* e *dmaemp1_3'R*] que amplificam a região 3' flanqueadora do gene [1515pb]; **BE**: Borda esquerda do vetor binário pPZP201BK; **BD**: Borda direita do vetor binário pPZP201BK; *gpdA*: promotor do *cassete de resistência* do gene *bar*; *bar*: gene que confere resistência a glifosinato de amônio; *trpc*: terminador do *cassete de resistência* do gene *bar*.

3.3.1. Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

De acordo com o protocolo estabelecido por Staats *et al.*, (2007), a transformação de *M. anisopliae* mediada por *A. tumefaciens* foi efetuada a partir de um pré-inóculo de *A. tumefaciens* contendo o vetor pPZP::*bar*::*emp1* cultivado por 24 horas à temperatura de 28 °C com agitação de 180 RPM em meio LB líquido acrescido de canamicina (50 µg/mL). Após o período de incubação, a OD₆₆₀ foi verificada. Estas células foram inoculadas em 10 mL de meio IM (controle negativo) e em 10 mL de meio IM+AS a uma concentração de 0,15 OD₆₆₀. As células foram cultivadas à 28 °C sob agitação de 180 RPM até a obtenção de OD₆₆₀ igual 0,45. Alíquotas de 100 µL dos cultivos em IM e IM+AS foram adicionadas a uma concentração de 10⁵ esporos de *M. anisopliae* e a mistura foi inoculada, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, sobre membranas de celofane dispostas sobre IM sólido e IM+AS sólido em placas de Petri, sendo incubadas a 25°C por dois dias. Após este período, 10 mL de meio MC sólido, acrescido de glifosinato de amônio (250 µg/mL), foram adicionados sobre as membranas. As placas foram incubadas novamente por 15 dias à 28 °C até o aparecimento de colônias resistentes. As colônias resistentes a glifosinato de amônio foram repicadas em meio MC contendo 250µg/mL de glifosinato de amônio e 200µg/mL de cefataxima para posterior *screening*. As linhagens transformantes se caracterizam pela inserção do *cassete* de inativação geralmente em cópia única em regiões aleatórias do genoma do fungo ou preferencialmente em regiões homólogas ao locus original do gene de interesse a ser inativado.

3.3.2. Seleção de transformantes com inserção do cassete de inativação para o gene *emp1*

Para realizar a seleção de transformantes com inserção do cassete de inativação pPZP::*bar*::*emp1*, foi efetuada a extração de DNA de esporo por fervura em forno de microondas, seguido de reações de PCR. Primeiramente, foi efetuado o PCR negativo para o gene *emp1* utilizando os *primers* [*emp1*RTF e *emp1*RTR] que amplificam (1) 798pb referente a porção codificadora do gene. E posteriormente, o PCR positivo para o gene *bar* utilizando os *primers* [BarF e

BarR] que amplificam (2) 566pb referente a porção codificadora do gene (Tabela 3).

Os transformantes que não apresentaram um sinal de amplificação referente ao gene *emp1* (798pb), neste primeiro *screening*, e que apresentaram um sinal de amplificação positivo para o gene *bar* (566pb) foram selecionados como os possíveis transformantes com recombinação homóloga do cassete de inativação no *locus* selvagem. Estes transformantes foram cultivados para posterior extração de DNA micelial e confirmação por hibridização *Southern*.

3.4. RESULTADOS

Na primeira etapa deste trabalho foi realizada a otimização de condições *in vitro* de indução dos estágios de diferenciação celular: apressório e blastosporos. A produção *in vitro* destas estruturas infectivas geradas por *Metarhizium*, foi efetuada com base em estudos anteriores de indução de apressório e produção de propágulos por fungos entomopatogênicos incluindo *M. anisopliae* (St Leger *et al.*, 1989, Vidal *et al.*, 1998, Fargues *et al.*, 2002, Ypsilos & Magan, 2004, Cliquet & Jackson, 2005, Xiao *et al.*, 1994).

3.4.1. Otimização de condições experimentais *in vitro* para a indução de diferentes tipos celulares produzidos por *M. anisopliae*

3.4.1.1. Indução *in vitro* de apressório

Inicialmente, a diferenciação *in vitro* de apressório por *M. anisopliae* linhagem E6 foi padronizada por Carvalho (2009), utilizando as mesmas condições de indução descritas por St Leger *et al.* (1989). No entanto, foi observado que essas condições de indução não se reproduziam na linhagem E6 de *Metarhizium*. Por essa razão, foram testadas diferentes concentrações do meio de cultivo (extrato de levedura – fonte de nitrogênio complexa) e inóculo, diferentes superfícies hidrofóbicas, e tempos de incubação.

A condição de diferenciação da qual se obteve um maior número de apressórios formados foi a partir de um inóculo de 5×10^5 ou 1×10^6 conídeos.mL⁻¹ de *M. anisopliae* linhagem E6, em 0,004% de solução de extrato de levedura, sob lamínulas de vidro por 16 horas de incubação a 28°C, sem agitação. A partir destas condições indutoras a formação de apressório por *M. anisopliae* linhagem E6, previamente padronizadas por Carvalho (2009); no presente trabalho, foi efetuada a otimização destas condições indutoras reproduzindo experimentos em maior escala para a obtenção de RNA total. Nestes experimentos de indução *in vitro* de apressório, foi observada a diferenciação de conídeos germinados em apressório em 12 e 16 horas de incubação a 28°C, utilizando um inóculo de 5×10^5 conídeos.mL⁻¹. Entretanto, em 16 horas de incubação foi observada uma maior quantidade de apressórios formados por lamínulas observadas, obtendo um

rendimento em torno de 60% dos conídeos germinados diferenciados em apressórios (Figura 4c e d).

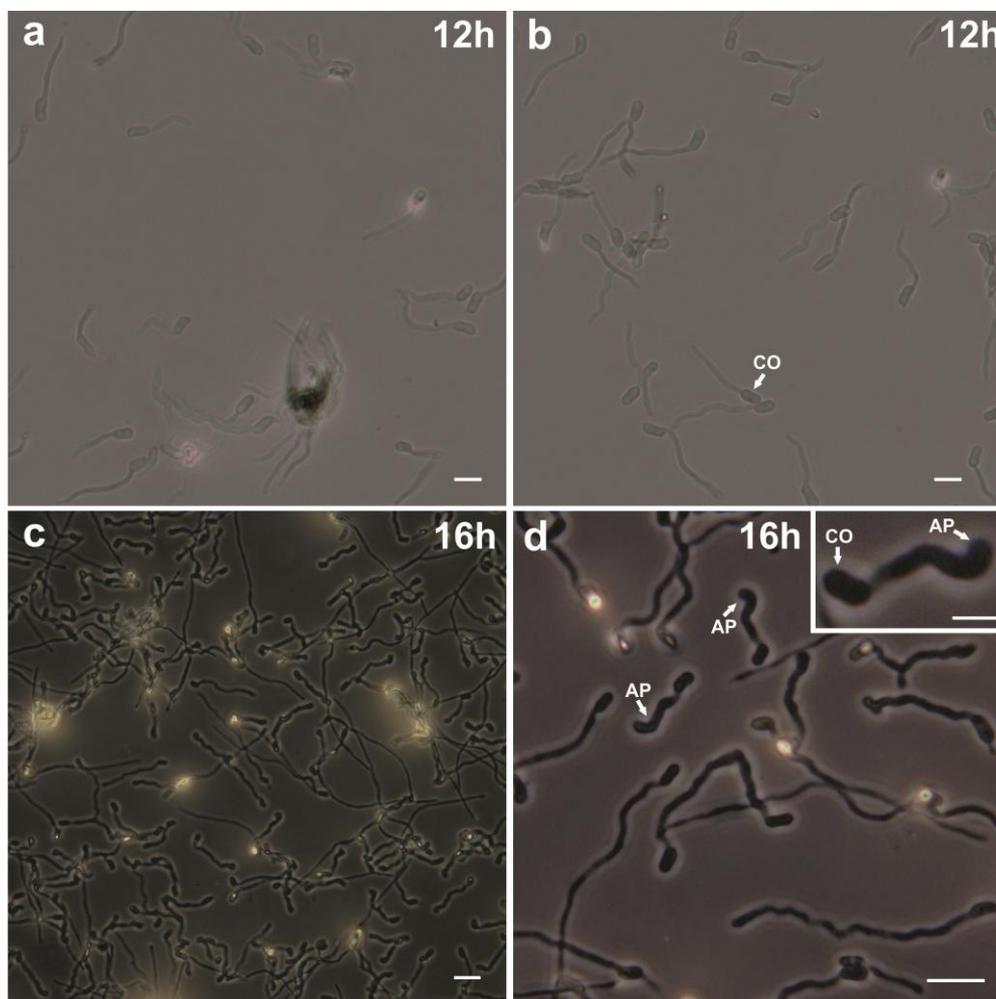


Figura 8 – Indução *in vitro* de apressório por *M. anisopliae*. Os painéis (a) e (b) mostram a condição de 12 horas de incubação (Barra: 10 μ m); (c) e (d) mostram a condição de 16 horas de incubação, induzindo a formação de apressórios (Barra: 20 μ m) e a parte superior do painel (d) demonstra o detalhe do conídio diferenciado em apressório, em maior aumento (Barra: 10 μ m). CO – conídeo; AP – Apressório.

3.4.1.2. Indução *in vitro* de blastosporos

Com base em estudos anteriores sobre formação de propágulos em diversos fungos filamentosos foi realizado inicialmente o estudo *in vitro* do tempo de curso da germinação dos esporos de *M. anisopliae* linhagem E6 até a formação de propágulos (blastosporos), em um meio de cultivo mimetizando a hemolinfa do hospedeiro.

Neste estudo *in vitro*, a fase inicial de germinação do conídio e crescimento vegetativo foi observada em 16 horas de incubação (Figura 9b). No decorrer do tempo foi observada a formação de hifas alongadas entre 24 e 30 horas de incubação, não apresentando blastosporos ainda formados (Figura 9c e d). Sendo que o estágio inicial da produção de blastosporos e corpos hifais por *M. anisopliae* foi observado em 36 horas de incubação (Figura 9e). Uma alta produção de blastosporos foi observada tanto em 48 como em 64 horas de cultivo, no entanto, em 64 horas ocorreu a produção ótima de blastosporos por *Metarhizium*, obtendo um rendimento de aproximadamente 10^8 blastosporos.mL⁻¹ (Figura 9f, g e h). A partir destas condições otimizadas *in vitro*, as que melhor mimetizaram os estágios de pós-penetração foram: 1) crescimento vegetativo em 24 horas de cultivo, e 2) produção ótima de blastosporos em 64 horas de cultivo. Sendo estas reproduzidas em maior escala para obtenção de RNA total.

Dessa forma, as condições indutoras dos diferentes tipos celulares (apressório, crescimento vegetativo e blastosporos) otimizadas no presente trabalho, foram utilizadas em análises do perfil transcricional do gene *emp1* (que integra o capítulo 1 da dissertação), e de quitinases putativas do genoma de *M. anisopliae* (que integra o capítulo 2 da dissertação), visando entender o possível envolvimento destes genes nos estágios de diferenciação celular propostos neste trabalho.

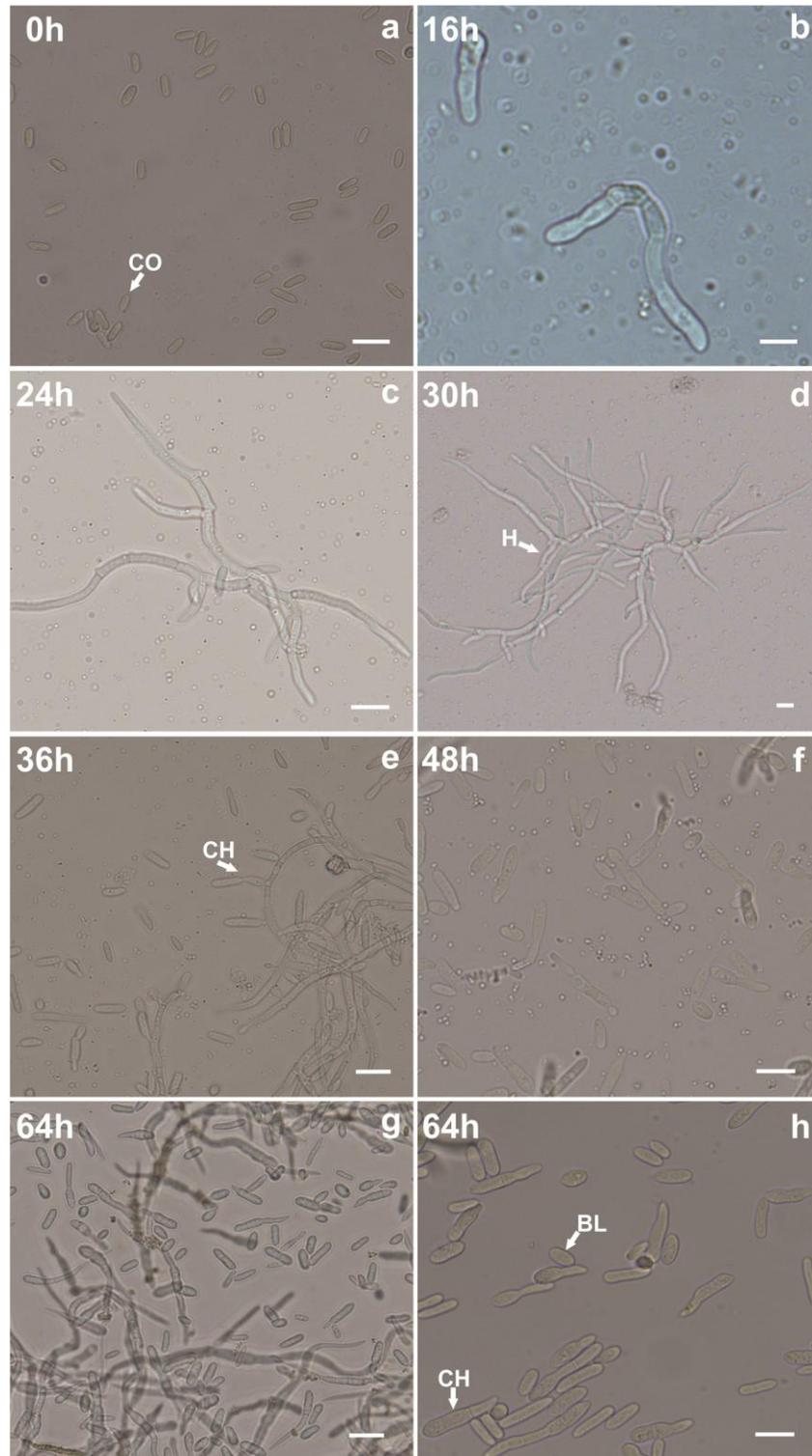


Figura 9 – Indução *in vitro* de estágios iniciais de crescimento vegetativo até a formação de Blastosporos. O painel acima demonstra o crescimento vegetativo nos estágios anteriores e posteriores a disseminação. (a) MO de conídeos de *M. anisopliae* linhagem E6; (b) conídeos *M. anisopliae* linhagem E6 cultivados em meio Adamék por 16

horas; (c) 24 horas de cultivo; (d) 30 horas de cultivo; (e) 36 horas; (f) 48 horas; (g) e (h) 64 horas, (h) em um maior aumento. (Barra: 20 μ m). CO – conídeo; H – hifa; CH – corpos hifais; BL – blastosporos; MO – microscopia óptica.

3.4.2. Avaliação da integridade do RNA total e síntese de cDNA

A integridade do RNA total de cada condição de diferenciação celular (apressório, crescimento vegetativo e blastosporos) pode ser evidenciada no Anexo 1. Na reação de controle negativo (para garantir a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total) foi observada a ausência de amplificação nas três condições de diferenciação celular (apressório, crescimento vegetativo e blastosporos) (Anexo 2). A partir destas avaliações de qualidade do RNA total, foi possível proceder às reações de transcrição reversa. A expressão constitutiva do gene beta-tubulina pode ser observada em todos os tipos celulares testados (Figura 10).

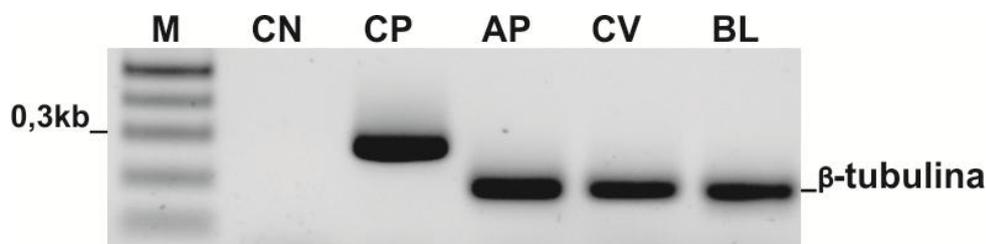


Figura 10 – Reação de controle positivo de cDNAs oriundos de diferentes tipos celulares de *M. anisopliae*. (M) Marcador DNA 1kb plus ladder; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo (amplicon com 300pb referente ao gene β -tubulina a partir de DNA genômico); (AP) população de cDNA oriunda da condição de apressório; (CV) população de cDNA oriunda da condição de crescimento vegetativo; (BL) população de cDNA oriunda da condição de blastosporos. (Todas as três condições de diferenciação apresentam um amplicon de 200pb referente ao gene da β -tubulina a partir de cDNA).

3.4.3. Análise transcricional do gene *emp1* em diferentes condições de diferenciação celular de *M. anisopliae*

O perfil transcricional do gene *emp1* foi analisado em diferentes tipos celulares produzidos por *M. anisopliae*. Dentre eles, estão células diferenciadas em apressórios, em crescimento vegetativo e blastosporos. O transcrito referente ao gene *emp1* está presente em todos os tipos celulares testados e não apresentou nenhuma alteração na regulação pós-transcricional, pois todas as populações de transcritos nas diferentes condições apresentaram um tamanho correspondente ao processamento normal de splicing (aproximadamente 674pb). Ensaio de RT-PCR demonstram maior abundância do transcrito do gene *emp1* na condição de apressório, enquanto que nas condições de crescimento vegetativo e blastosporos parece que este gene possui uma expressão menor em relação ao gene normalizador *β-tubulina* (Figura 11).

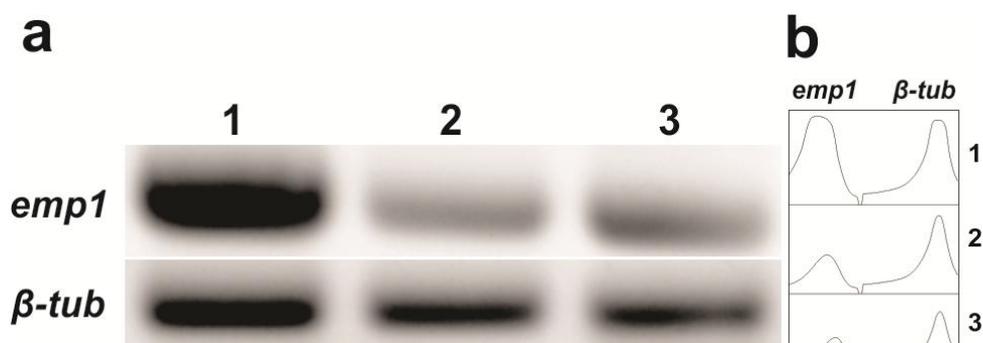


Figura 11 – Perfil transcricional do gene *emp1* em diferentes condições de diferenciação celular de *M. anisopliae*. No painel **a** está representado um RT-PCR de cDNA sintetizado a partir de mRNA extraído dos tipos celulares: apressório, crescimento vegetativo (hifas) e blastosporos. A parte superior do painel (**a**) representa amplicons de transcritos do gene *emp1* (674pb); e a parte inferior do painel (**a**) representa amplicons de transcritos do gene *β-tubulina* (200pb). No painel (**b**) está representada uma análise densitométrica do perfil transcricional do gene *emp1* e do gene normalizador *β-tubulina*. (1) cDNA obtido da condição de apressório; (2) cDNA obtido da condição de crescimento vegetativo (hifas); (3) cDNA obtido da condição de blastosporos.

3.4.4. Isolamento das regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene *emp1*

Inicialmente, nosso grupo de pesquisa isolou regiões 5' (408pb) e 3' (503pb) do gene *emp1* (Carvalho, 2009), utilizando a metodologia *Genome walking* (Rishi *et al.*, 2004). A partir destas sequências isoladas foi construído um cassete de inativação para o gene *emp1*. Nesta etapa, *rounds* de agrotransformação foram efetuados gerando 185 transformantes no primeiro, e 240 transformantes no segundo (Staats *et al.*, 2007), porém todos apresentaram recombinação ectópica.

Por essa razão, partimos para uma nova construção de um cassete de inativação para o gene *emp1* com regiões flanqueadoras de maior tamanho. Através do sequenciamento do genoma de *M. anisopliae* foi possível elaborar oligonucleotídeos que amplificam regiões 5' e 3' flanqueadoras do gene *emp1* contendo 1513pb e 1515pb, respectivamente (Figura 6 e 7). A partir disso, inicialmente foi efetuado o isolamento de ambas regiões flanqueadoras do gene 5' e 3', através de reações de PCR, como pode ser observado no gel de agarose da Figura 12, a confirmação do tamanho das respectivas bandas. Na sequência estas foram clonadas e confirmadas por sequenciamento para posterior montagem do cassete de inativação para o gene *emp1*.

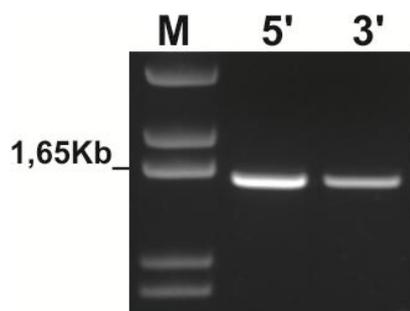


Figura 12 – Amplicons gerados a partir das regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene *emp1* de *M. anisopliae*. (M) marcador 1kb plus DNA ladder; (5') porção 5' flanqueadora do gene *emp1* (amplicon com aproximadamente 1500pb); (3') porção 3' flanqueadora do gene *emp1* (amplicon com aproximadamente 1500pb).

3.4.5. Confirmação da montagem do cassete pPZP::*bar*::*emp1*

A montagem do cassete pPZP::*bar*::*emp1* foi verificada através de clivagens e reações de PCR, a cada etapa da subclonagem. Entretanto, a clivagem nos diferentes sítios de restrição que estão presentes na montagem final do cassete pPZP::*bar*::*emp1* foi parcial, assim dificultando a definição do tamanho das porções que constituem o cassete de inativação, no gel de agarose. Por essa razão, a confirmação da montagem final foi efetuada por reações de PCR, amplificando as porções 5' e 3' com tamanho referente ao controle positivo (aproximadamente 1500pb) e a porção codificante do gene *Bar* (aproximadamente 566pb), como pode ser observado na Figura 13.

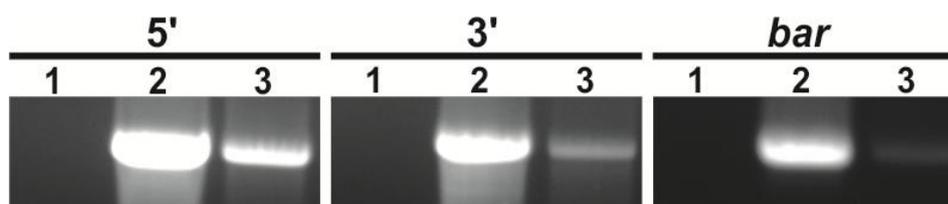


Figura 13 – Confirmação da montagem do cassete pPZP::*bar*::*emp1*. (1) controle negativo da reação; (2) controle positivo das reações; (3) cassete de inativação para o gene *emp1* (pPZP::*bar*::*emp1*) utilizado como molde para a reação. (5') amplicons da região 5' flanqueadora do gene *emp1* (1513pb); (3') amplicons da região 3' flanqueadora do gene *emp1* (1515pb); (*bar*) amplicons do gene *bar* (566pb) (que confere resistência a glifosinato de amônio).

3.4.6. Seleção de possíveis transformantes de *M. anisopliae* inativados para o gene *emp1*

Em uma etapa de agrotransformação, com o cassete de inativação para o gene *emp1*, foram gerados 216 transformantes. Esses transformantes apresentaram seu desenvolvimento mais lento em relação a outros transformantes gerados anteriormente. Ao invés de ocorrer esporulação de 10 a 14 dias esses transformantes levaram em torno de 30 dias até esporularem (Figura 14). A instabilidade da marca de resistência a glifosinato de amônio pode

ter influenciado no desenvolvimento destes fungos transformantes. Apesar destas alterações no tempo de desenvolvimento dos fungos transformantes, não foram observadas alterações na coloração do micélio e dos conídios.

Inicialmente foi efetuada a seleção dos possíveis transformantes inativados para o gene *emp1* (recombinação homóloga), através da reação de PCR negativo, utilizando DNA do esporo e *primers* dos quais amplificam a porção codificadora do gene *emp1*. A banda correspondente a 800pb no tipo selvagem, é referente à ORF do gene *emp1*, ou nos transformantes com recombinação ectópica. Dos 72 transformantes, apenas 8 (33, 38, 54, 58, 59, 66, 67, 68) não apresentaram banda correspondente ao locus selvagem do gene *emp1* (800pb). Apesar do transformante (56) aparentemente não apresentar banda correspondente ao gene *emp1* (800pb), como pode ser observado na Figura 15, sob uma maior exposição do gel a radiação UV, esta foi evidenciada. Posteriormente foi realizada a confirmação dos 8 transformantes, novamente pelo PCR negativo, utilizando uma maior quantidade de DNA molde e maior número de ciclos na reação de PCR. Nesta etapa foi demonstrado que apenas os transformantes 33, 54, 58, 66, e 68 não apresentam a banda referente ao locus selvagem (800pb) (Figura 16). Mesmo que estes fungos transformantes se desenvolveram no meio seletivo contendo glifosinato de amônio, a presença do gene (*bar*) que confere resistência a glifosinato de amônio foi testada por PCR. Apenas 3 transformantes [54, 59 e 67,(menos evidente)] apresentam a banda correspondente (566pb) ao gene *bar* (Figura 17). A partir destes resultados, o transformante 54 parece ser um possível mutante nulo para o gene *emp1*. Apesar disso, são necessárias outras confirmações por PCR utilizando o DNA purificado dos transformantes, pois a extração de DNA do esporo por fervura pode conter enzimas que degradam DNA (DNAse) ou até mesmo debris celulares que podem inibir a reação de PCR. E por fim, uma confirmação por análises de hibridização *Southern*.

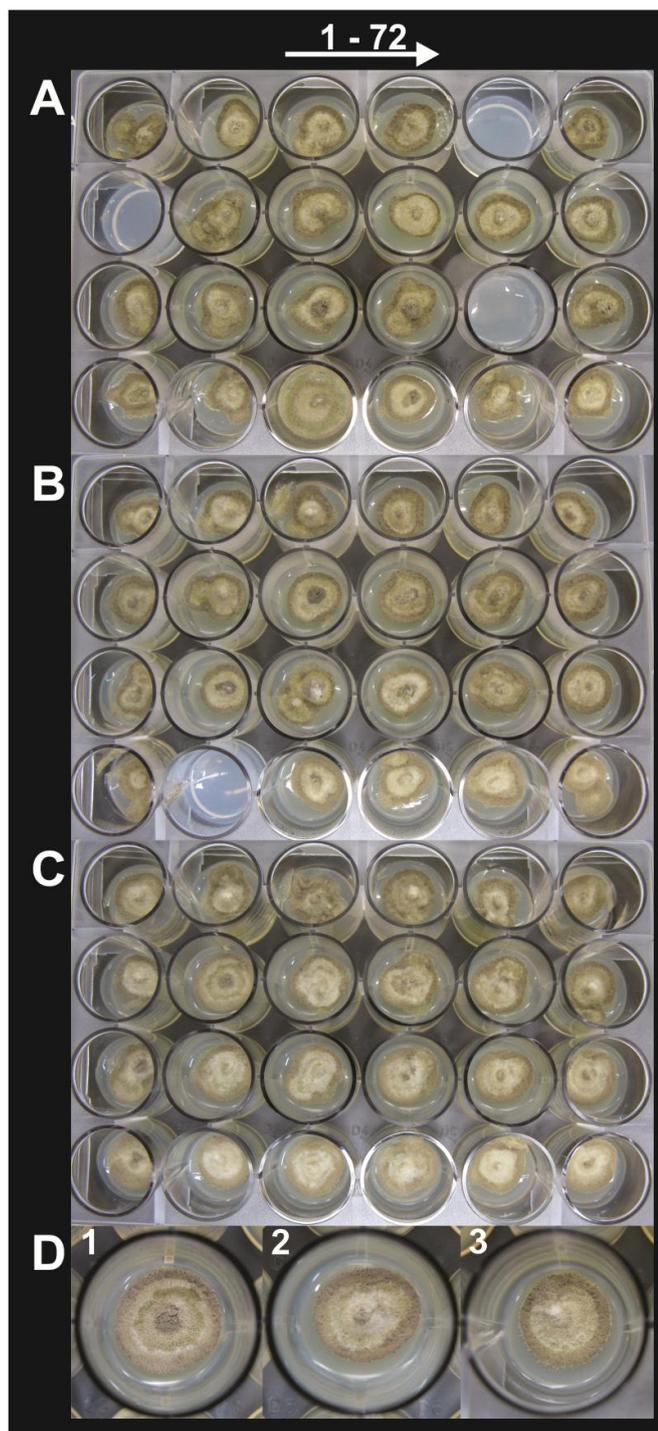


Figura 14 – Características morfológicas dos transformantes de *M. anisopliae* contendo o cassete de inativação pPZP::*bar*::*emp1*. (A) transformantes (pPZP::*bar*::*emp1*) 1 a 24; (B) 25 a 48; (C) 49 a 72; (D) detalhe dos transformantes (D1) transformante 56; (D2) transformante 65; (D3) transformante 68.

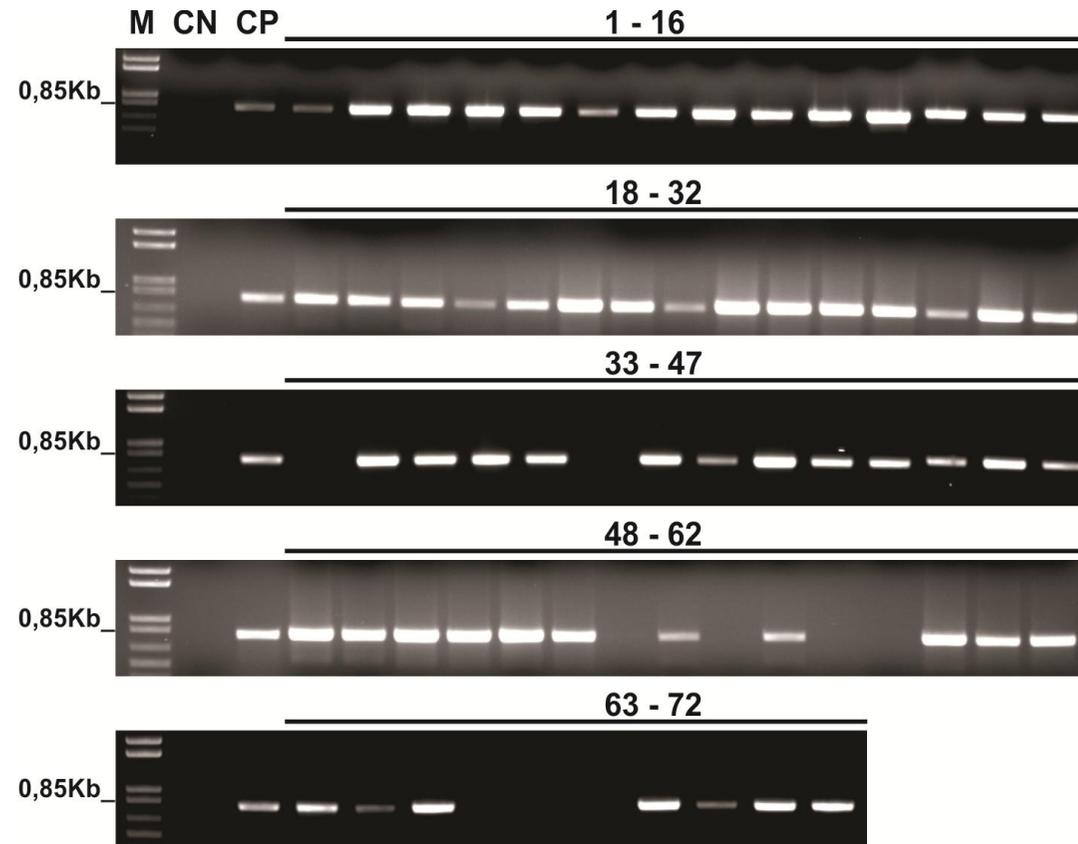


Figura 15 – Seleção dos possíveis transformantes de *M. anisopliae* inativados para o gene *emp1* por PCR. (M) marcador 1kb plus DNA ladder; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo (amplicon com aproximadamente 800pb referente a região codificante do gene *emp1*); (1 a 72) DNA genômico de transformantes pPZP::*bar*::*emp1* utilizado como molde para as reações (presença do amplicon de 800pb – transformante com recombinação ectópica; ausência do amplicon de 800pb – transformante com provável recombinação homóloga).

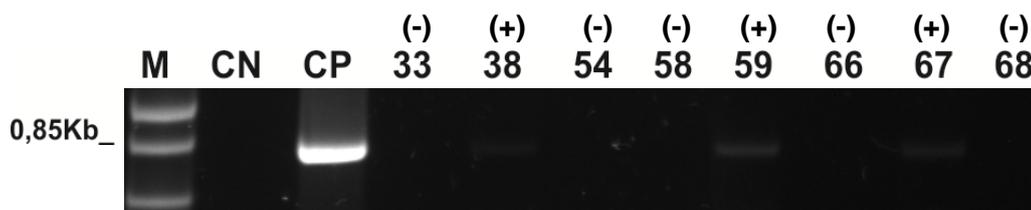


Figura 16 – Confirmação dos possíveis transformantes de *M. anisopliae* inativados para o gene *emp1*. (M) marcador 1kb plus DNA ladder; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo (amplicon com tamanho de 800pb correspondente a porção codificante do gene *emp1*); (33, 38, 54, 58, 59, 66, 67, 68) transformantes testados, (-) ausência e (+) presença de amplicon referente ao gene *emp1*.

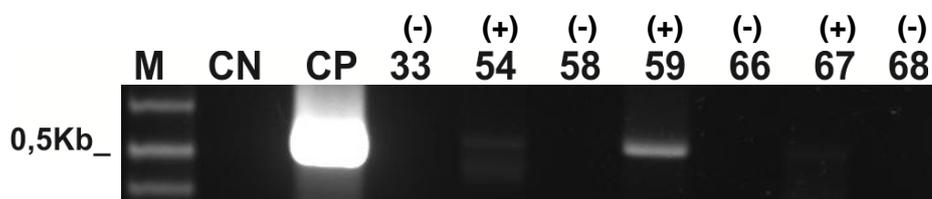


Figura 17 – Confirmação da marca de resistência a glifosinato de amônio (gene *bar*) dos transformantes. (M) marcador 1kb plus DNA ladder; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo (amplicon com tamanho de 560pb referente ao gene *bar*); (33, 54, 58, 59, 66, 67, 68) transformantes testados, (-) ausência e (+) presença de amplicon referente ao gene *bar*.

3.5. DISCUSSÃO

As alterações morfológicas produzidas por *M. anisopliae* durante o processo de infecção, principalmente a formação de apressório e blastosporos, representam estágios cruciais da pré-penetração e pós-penetração na cutícula hospedeira. Por isso, a compreensão destes estágios de diferenciação celular pode auxiliar na busca por fatores-chaves do processo de infecção, dos quais podem ser determinantes de virulência para o fungo (Arruda *et al.*, 2005, Clarkson & Charnley, 1996). Abordagens de genômica funcional têm evidenciado diversos aspectos como vias de sinalização celular, estímulos ambientais e determinantes do controle genético envolvidos na diferenciação do apressório de fungos fitopatogênicos (Wilson & Talbot, 2009), entretanto pouco se sabe sobre esse estágio de diferenciação em fungos entomopatogênicos.

Sabe-se que a diferenciação do apressório, por *Metarhizium* na cutícula do inseto-hospedeiro, é essencial para que ocorra a penetração direta na superfície cuticular hospedeira. Além disso, é um processo dependente tanto da disponibilidade de nutrientes encontrada no meio, quanto da natureza da superfície em que o fungo está em contato. St Leger *et al.* (1989) descreveram que para ocorrer o processo de diferenciação em apressório *in vitro* são necessários estímulos de superfície como rigidez e hidrofobicidade e a presença de fontes externas de nutrientes com baixos níveis de nitrogênio. Neste estudo, foi demonstrada uma maior taxa de diferenciação (maior que 70%) em superfícies hidrofóbicas quando comparado a superfícies hidrofílicas (menor que 40%). Outro modelo já observado foi o fitopatogêno *M. grisea*, que também apresentou indução de apressório sob os mesmos estímulos, no entanto, algumas linhagens deste fungo podem se diferenciar em apressório na ausência de fonte nutricional, necessitando apenas da presença de água (Xiao *et al.*, 1994).

Anteriormente, Carvalho (2009) testou a diferenciação *in vitro* de apressório por *M. anisopliae* da linhagem E6, utilizando as mesmas condições de indução descritas por St. Leger *et al.*, (1989), no entanto, estas condições de indução não se reproduziram para a linhagem E6 de *M. anisopliae*, utilizada por nosso grupo. Por essa razão, Carvalho (2009) realizou uma padronização da diferenciação *in vitro* de apressório com diferentes concentrações de conídios de *M. anisopliae*

linhagem E6, concentrações de compostos nitrogenados, superfícies hidrofóbicas, temperaturas, e tempos de cultivo, para atingir um rendimento igual ou maior que 70% de conídios diferenciados em apressório.

Nos experimentos de otimização da indução *in vitro* de apressório (em maior escala), do presente trabalho, sob as mesmas condições padronizadas por Carvalho (2009), foi observado um rendimento máximo de 60% de conídeos diferenciados em apressórios em 16 horas de incubação. Esse rendimento de apressórios observado em nossos estudos *in vitro* de apressórios foi menor quando comparado aos estudos demonstrados por Carvalho (2009) e St. Leger *et al.*, (1989), pois estes autores reportaram um rendimento de aproximadamente 70% dos conídios germinados de *M. anisopliae* diferenciados em apressórios.

Alguns aspectos experimentais podem estar relacionados aos resultados encontrados em nosso trabalho. Dentre eles, o número de lamínulas por placas, a concentração de conídios utilizada, e/ou a não sincronização do tempo de crescimento dos conídios devido ao manuseio das placas de Petri contendo já os conídios, nos experimentos de maior escala (com 500 lamínulas).

Outro fator que também pode estar associado ao baixo rendimento de apressórios, é a produção de moléculas auto-reguladoras pelo fungo, através de mecanismos de *quorum sensing*, das quais controlam alterações morfológicas inibindo a formação do tubo germinativo (Chen & Fink, 2006). A produção de auto-inibidores é descrita em diversos fungos filamentosos. Hegde & Kolattukudy (1997) identificaram autoinibidores de característica lipofílica em conídios de *M. grisea* que inibem de maneira dose-dependente a germinação e formação de apressório em densas populações de conídios (10^5 e 10^6 conídios.mL⁻¹). Apesar disso, esta inibição pode ser revertida pela presença de lipídios (ceras) da superfície da folha do arroz que então desencadeiam a germinação e formação de apressório no fungo.

Também foi demonstrada a produção de autoinibidores por outros fungos filamentosos, como por exemplo, *Uromyces phaseoli* que produz concentrações nanomolares de metil 3,4-dimetoxicinamato, composto que é efetivo na inibição da germinação, pois para que esta ocorra é necessário remover este componente da água. Além disso, este mecanismo garante uma vantagem adaptativa que é a

redução da auto-competição dentro de uma mesma população de esporos, pois previne a germinação prematura do esporo logo após a conidiação e antes que o esporo seja disperso no ambiente. Outro autoinibidor da germinação, micosporina-alanina, foi identificado na mucilagem que circunda conídios de espécies do gênero *Colletotrichum* spp. (Chitarra *et al.*, 2004). Ainda, em culturas de *Glomerella cingulata*, um fator difusível não identificado, reduziu a formação de micélio com um aumento concomitante da formação de conídios em densidades superiores a 10^6 células por mL (Hogan, 2006).

Com base nesses estudos, o baixo rendimento encontrado em nosso estudo (aproximadamente 60% de conídios de *M. anisopliae* diferenciados em apressórios), pode ser também explicado pela presença de possíveis auto-inibidores produzidos pela densa população de conídios (5×10^5 conídios.mL⁻¹) durante a diferenciação *in vitro*. Apesar de não realizarmos experimentos para a detecção da presença de auto-inibidores em nossos cultivos de indução de apressório, esta possibilidade não pode ser descartada, pois a presença dessas moléculas pode ter inibido uma parte dos conídios a formar apressório.

Apesar do processo de infecção de *M. anisopliae* ser bem caracterizado, seus mecanismos de infecção em estágios de posteriores a penetração da cutícula, ainda não estão completamente elucidados. Com o intuito de contribuir para o entendimento de estágios pós-penetração do processo de infecção por *Metarhizium*, neste trabalho, realizamos a otimização da indução *in vitro* de blastosporos através do estudo do tempo de curso da diferenciação celular a partir do estágio de germinação e crescimento vegetativo até a formação de propágulos infectivos. E esta otimização foi efetuada com base em estudos anteriores de produção de propágulos por fungos entomopatogênicos incluindo *M. anisopliae* (Vidal *et al.*, 1998, Fargues *et al.*, 2002, Ypsilos & Magan, 2004, Cliquet & Jackson, 2005).

O estágio de pós-penetração é caracterizado pela formação de hifas alongadas, das quais crescem vegetativamente na epiderme até atingir a hemocele do inseto-hospedeiro (Thomas & Read, 2007). Após *Metarhizium* atingir a hemolinfa do hospedeiro, o fungo se diferencia em estruturas infectivas chamadas blastosporos unicelulares (leveduriformes), e corpos hifais

multicelulares (estruturas de vários tamanhos e formas que se diferenciam a partir de blastosporos na hemolinfa do inseto). Estudos *in vivo* demonstraram que após esta fase de apenas crescimento vegetativo, as hifas de *Metarhizium*, ao entrar em contato com a hemolinfa se diferenciam em blastosporos e corpos hifais resultando na completa disseminação e evasão do sistema imune do inseto-hospedeiro (Wang & St Leger, 2006).

Da mesma forma que estudos *in vivo* demonstram a formação de blastosporos na hemolinfa do inseto, em nossos experimentos *in vitro* foi possível induzir a formação destes propágulos por *Metarhizium*, através da utilização do meio de cultivo Adamék que mimetiza a hemolinfa de insetos (Ypsilos & Magan, 2004). A produção ótima observada em nossos experimentos (10^8 blastosporos.mL⁻¹ em 64 horas de incubação) está de acordo com diversos estudos de produção de propágulos de diferentes fungos filamentosos. O tempo de crescimento do fungo *Paecilomyces fumosoroseus* com altas concentrações de propágulos ($1,4 - 5,5 \times 10^8$ propágulos.mL⁻¹) ocorre entre 48 e 72 horas de incubação (Vidal *et al.*, 1998). Ainda, Fargues *et al.*, (2001) mostraram altas concentrações de propágulos de *Metarhizium flavoviride* em meio Adamek após 72 horas de incubação, como também, Ypsilos e Magan (2004) obtiveram um rendimento ótimo de blastosporos de *M. anisopliae* após 72 horas de incubação. Ortiz-Urquiza *et al.*, (2010) evidenciaram o melhor rendimento na produção de blastosporos por *M. anisopliae* quando utilizaram o meio de cultivo Adamék, em comparação a diferentes meios de cultivos.

De acordo com Ahn *et al.*, (2004) foi detectado um maior nível de expressão do gene *emp1* de *M. grisea*, durante a formação do apressório, quando comparado às condições de crescimento vegetativo e conídios. Da mesma forma, no presente trabalho foi demonstrado um padrão transcricional do gene *emp1* em *M. anisopliae* mais evidente na condição de formação de apressório em comparação ao crescimento vegetativo e blastosporos. Ainda, estudos recentes demonstram por análises transcricionais de duas espécies de *Metarhizium* (*M. anisopliae* e *M. acridum*) que diversos genes relacionados à diferenciação do apressório foram altamente expressos tanto em condições de infecção sobre cutículas de *Periplaneta americana* como *Locusta migratoria*. Dentre os genes

altamente expressos nessas condições inclui os que codificam proteínas de choque térmico, proteínas de parede celular, subtilisinas, uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a subunidade alfa da proteína G, uma proteína quinases ativadas por mitógenos, uma proteína quinase C, uma quinase dependente de Ca/calmodulina, entre outros (Gao *et al.*, 2011). Além desses, um gene que codifica uma proteína precursora de matriz extracelular (homólogo ao gene *emp1* de *M. anisopliae* linhagem E6) foi altamente expresso em *M. anisopliae* infectando cutículas de *P. americana* (Gao *et al.*, 2011). Dessa maneira, estes dados sugerem uma função potencial de *emp1* no processo de diferenciação de apressório, no entanto, estudos funcionais são necessários para tal comprovação.

Com o intuito de elucidar a função deste gene, linhagens transformantes contendo um cassete de inativação do gene *emp1* foram geradas através de agrotransformação.

A transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) tem sido utilizada em um grande número de fungos filamentosos e leveduras como uma importante ferramenta para análise funcional de genomas. A inativação gênica por recombinação homóloga através de ATMT é a principal forma de atribuir funções a genes. Esta estratégia é baseada na construção de um cassete que contenha uma marca de seleção flanqueada, nas duas extremidades, por fragmentos do gene alvo da inativação (Weld *et al.*, 2006).

Ao contrário de leveduras, a mutagênese direcionada em fungos filamentosos é mais difícil, pois requer cassetes de disrupção contendo porções flanqueadoras de DNA homólogas igual ou maior que 1000pb; mesmo assim a frequência de recombinação homóloga pode variar de 0,5 a 30% (Michielse *et al.*, 2005). Por essa razão, foi construído um cassete de inativação contendo 1500pb das porções 5' e 3' flanqueadoras do gene *emp1*, flaqueando a marca de resistência a glifosinato de amônio (cassete de expressão do gene *bar*). E através da metodologia de ATMT descrita por Staats *et al.*, (2007) (da qual demonstra ser eficiente na geração de mutantes nulos em *M. anisopliae*, apresentando uma frequência de recombinação homóloga de 20%) foram geradas linhagens transformantes contendo o vetor pPZP::*bar*::*emp1*. No presente trabalho foi observada uma frequência de transformação superior a 60%, porém em apenas

1,5% dos transformantes parecem ter recombinação homóloga. Apesar destes indicativos para um possível mutante nulo do gene *emp1*, confirmações através de sonda de hibridização são necessárias para validar estes resultados.

3.6. PERSPECTIVAS

Selecionar linhagens transformantes com possível inserção homóloga do cassete pPZP::*bar*::*emp1*, e confirmação da inserção por sonda de hibridização;

Analisar funcionalmente as linhagens inativadas para o gene *emp1* em relação à formação de apressório e patogenicidade de *M. anisopliae*, incluindo ensaios de indução *in vitro* de apressório e bioensaios.

Purificação da proteína Emp1 e imunolocalização da proteína nos diferentes tipos celulares que o fungo produz.

4. CAPÍTULO 2

Análise do padrão transcricional de quitinases durante estágios de formação de apressório, crescimento vegetativo e blastosporos de *Metarhizium anisopliae*.

4.1. Revisão bibliográfica

4.1.1. Quitinases em Fungos

A quitina, um homopolímero linear insolúvel composto de subunidades do amino açúcar acetilado N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos por ligações β -1,4. É o principal constituinte do exoesqueleto de invertebrados e da parede celular de fungos (Adams, 2004, Duo-Chuan, 2006). Na natureza, é o segundo biopolímero mais abundante (precedida apenas pela celulose), apresentando dois principais tipos: α -quitina e β -quitina que são caracterizados pelo arranjo das cadeias de N-acetilglicosamina de forma antiparalela e paralela, respectivamente (Dahiya *et al.*, 2006). Este polímero cristalino possui uma enorme força de tração o que contribui significativamente para a rigidez da parede celular de fungos, sendo esta uma barreira essencial frente à patógenos e a fatores de estresse incluindo dissecação e alta pressão osmótica (Bowman & Free, 2006). A hidrólise completa deste polímero para a liberação de monômeros de N-acetilglicosamina é efetuada pela ação sinérgica e consecutiva de um sistema quitinolítico (Patil *et al.*, 2000).

As quitinases (E.C. 3.2.1.14) são enzimas que hidrolisam ligações β -1,4 presentes no polímero de quitina, produzindo oligômeros e monômeros de (GlcNAc) que posteriormente podem ser re-utilizados na síntese de quitina ou como fonte nutricional pelo organismo. Estas enzimas podem ser classificadas como endo ou exoquitinases. As endoquitinases clivam o polímero em sítios aleatórios no interior da cadeia liberando quito-oligômeros (quitotetraose, quitotriose). E as exoquitinases clivam o polímero a partir de sua extremidade não redutora e o produto liberado são dímeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc)₂ (Duo-Chuan, 2006, Van Aalten *et al.*, 2001). Entretanto, também foram descritas atividades de endo e exoquitinase em uma mesma quitinase (Da Silva *et al.*, 2005). Diferentemente destas, as N-acetilglicosaminidases (E.C. 3.2.1.52)

hidrolisam os produtos gerados pelas quitinases como quitobiose e oligômeros de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) (Duo-Chuan, 2006).

De acordo com o sistema de classificação do banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes; Coutinho, 1999, Cantarel *et al.*, 2009) baseado na similaridade de sequências de aminoácidos presente em domínios catalíticos, as quitinases podem ser distribuídas nas famílias 18, 19 e 20 das glicosil-hidrolases (GH, E.C. 3.2.1.-). Quitinases da família GH20, constituída por *N*-acetilglicosaminidases, são descritas em bactérias, fungos e humanos (Duo-Chuan, 2006). As quitinases pertencentes à família GH18 podem ser encontradas em bactérias, vírus, leveduras, fungos filamentosos, plantas e animais. Entretanto aquelas pertencentes à família GH19 são encontradas exclusivamente em plantas. Estas duas famílias de quitinases (GH18 e GH19) não apresentam similaridade de sequência entre si, e possuem estruturas tridimensionais diferentes.

A família GH18 tem um domínio catalítico em forma de barril contendo oito α -hélices e oito fitas β -pregueadas (α/β)₈, enquanto que a família GH19 apresenta uma estrutura bilobada que é composta principalmente por α -hélices. Quanto ao mecanismo de ação, estas quitinases se diferem por suas configurações anoméricas: a família GH18 apresenta configuração β , e mecanismo de retenção; e a família GH19 apresenta configuração α , e mecanismo de inversão. Outra diferença é a sensibilidade por alosamidina, que inibe apenas as quitinases da família GH18 (Koga *et al.*, 1999). Esta divergência sugere uma diferença na ancestralidade (Davies & Henrissat, 1995).

Fungos filamentosos apresentam entre 10 e 25 diferentes quitinases em seu genoma. Porém, apenas nos últimos anos, o aumento de projetos de sequenciamento de genomas de fungos nos permitiu acessar toda a gama e a diversidade de quitinases fúngicas (Seidl, 2008). As quitinases de fungos pertencem à família GH18. Estas são caracterizadas por apresentar multidomínios em sua estrutura: domínio catalítico característico da família GH18, domínio de ligação a quitina (ChBD), domínio de ligação a celulose (CBD), domínio de ligação a peptidoglicana (LysM), porção N-terminal contendo peptídeo sinal, e uma região rica em resíduos de serina/treonina. Com base na

estrutura das quitinases e em sua similaridade com quitinases vegetais ou bacterianas, as quitinases fúngicas são divididas em diferentes subfamílias, classes ou grupos. Estas classes são denominadas fúngica/bacteriana (Classe V) ou fúngica/vegetal (Classe III) (Jaques *et al.*, 2003, Hamel *et al.*, 1997, Duo-Chuan, 2006). Entretanto, por análises filogenéticas, (Seidl *et al.*, 2005) foram propostos três subgrupos: A, B (correspondentes a classe V e III, respectivamente), e um novo subgrupo C que se caracteriza por apresentar quitinases de alta massa molecular e por possuir um domínio similar a toxinas *Killer* de *Kluyveromyces lactis* (Gruber *et al.*, 2010).

O subgrupo A (antiga classe V) de quitinases está presente em todos os genomas de fungos. Estas enzimas são caracterizadas por apresentar um domínio catalítico e massa molecular média de 40 – 50kDa, mas não possui domínios de ligação a carboidrato (CBMs). Muitas quitinases deste subgrupo apresentam peptídeo sinal na porção N-terminal, que as direciona para rotas de secreção sendo estas proteínas extracelulares. Entretanto algumas são preditas como proteínas intracelulares, ou possuem sequência de endereçamento ao retículo endoplasmático (Seidl, 2008).

O subgrupo B é caracterizado por apresentar quitinases com muita variação em tamanhos (podendo variar em massa molecular de 30 a 90kDa) e na estrutura de domínios. Ao contrário do subgrupo A, o subgrupo B agrupa pequenas proteínas (30-45kDa) que contêm CBMs, e também quitinases maiores (90kDa) que contêm longos domínios não estruturados ricos em resíduos de serina/treonina e/ou um sinal de ancoramento a GPI, indicando ligação da proteína madura a membrana plasmática.

O subgrupo C é um novo grupo de quitinases fúngicas. Sendo a primeira quitinase descrita deste grupo oriunda de *Trichoderma atroviride* (CHI18-10) (Seidl *et al.*, 2005). Este subgrupo apresenta tipicamente proteínas com massa molecular de 140-170kDa, que podem apresentar peptídeo sinal na porção N-terminal levando a rotas de secreção. Outras características deste subgrupo são a presença de domínios de ligação a quitina (CBM18) e domínios múltiplos LysM (pequenos domínios de peptídeos que podem ligar-se a peptideoglicana) (Seidl, 2008, Karlsson & Stenlid, 2008, Seidl *et al.*, 2005).

De acordo com sua distribuição em espécies de todos os reinos, as quitinases apresentam uma ampla diversidade quanto as suas funções, dentre elas: nutrição, ecdise em artrópodes, imunidade e patogenicidade (Arakane & Muthukrishnan, 2010, Gooday, 1999). Em humanos, as quitinases parecem estar envolvidas na defesa contra patógenos fúngicos e na patogênese da asma (Wu *et al.*, 2010, Shuhui *et al.*, 2009, Vicencio *et al.*, 2008, Ober & Chupp, 2009). Em outros vertebrados as quitinases estão presentes no trato digestivo (Suzuki *et al.*, 2002). Em insetos, esta classe de enzimas participa tanto da renovação da carapaça quitinosa (Arakane & Muthukrishnan, 2010, Merzendorfer & Zimoch, 2003) como também da digestão do conteúdo de quitina na membrana peritrófica do intestino (Khajuria *et al.*, 2010). Em plantas, as quitinases possuem um papel importante no desenvolvimento, em condições de estresses, na defesa contra fungos fitopatogênicos, e também na interação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio e micorrizas (Kasprzewska, 2003).

Em fungos, sabe-se que o potencial das funções fisiológicas do sistema quitinolítico inclui: i) o remodelamento da parede celular durante o crescimento das hifas, ramificações, fusão e autólise; ii) a degradação de quitina exógena presente na parede celular de fragmentos de hifas autolisados ou no exoesqueleto de artrópodes mortos, como fonte nutricional; iii) na competição e defesa contra outros fungos ou artrópodes no habitat, a atuação de quitinases como fatores de virulência em fungos mico e entomopatogênicos (Seidl, 2008, Boldo *et al.*, 2009).

Devido à enorme importância das funções biofisiológicas e aplicações das quitinases fúngicas, estas enzimas têm sido alvo de muitos estudos. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel funcional de cada uma das quitinases no ciclo de vida e de infecção dos microrganismos. Grande parte dos estudos existentes tem demonstrado apenas alterações em níveis transcricionais ou na atividade de quitinases secretadas frente a diferentes condições de cultivo, porém poucos são os estudos que demonstram a função gênica e alterações fenotípicas, a partir de mutantes nulos. Considerando os diferentes tipos celulares produzidos pelos fungos durante seu ciclo de vida, estudos em leveduras demonstram genes de quitinases com provável envolvimento na diferenciação celular.

Em *Saccharomyces cerevisiae* a endoquitinase CTS1 está envolvida na separação das células após a divisão, pois a disrupção deste gene resultou no bloqueio da separação das células formando grandes agregados de células presas por suas regiões de septo (Kuranda & Robbins, 1991). Da mesma forma ocorreu em *Candida albicans* com a deleção do gene *Cht2* (McCreath *et al.*, 1995, McCreath *et al.*, 1996). A levedura *Kluyveromyces lactis* secreta uma proteína KICts1p com atividade de endoquitinase, que apresenta o envolvimento na citocinese normal, provavelmente para facilitar a degradação da quitina presente no septo durante a divisão celular (Colussi *et al.*, 2005, Butler *et al.*, 1991). As quitinases também podem desempenhar um papel importante na reprodução sexuada de leveduras. Baker *et al.*, (2009) demonstraram que a deleção de quatro genes de endoquitinases (Chi2, Chi21, Chi22, and Chi4) em uma linhagem mutante de *Cryptococcus neoformans* não alterou o crescimento e morfologia da levedura durante a reprodução assexuada. Entretanto, ensaios de *mating* indicaram o envolvimento das endoquitinases Chi2, Chi21, e Chi4 na reprodução sexuada.

Os fungos filamentosos, com quitina como principal componente de sua parede celular, produzem quitinases em todas as fases do crescimento incluindo a esporulação, a germinação, o crescimento exponencial, o desenvolvimento micelial, e a autólise (Gooday, 1992, Duo-Chuan, 2006). A parede celular dos fungos é dinâmica e tem função em processos celulares importantes. Esta fornece resistência mecânica suficiente para suportar alterações na pressão osmótica impostas pelo ambiente. Ao mesmo tempo, a parede celular deve manter sua plasticidade adequada para permitir o crescimento das células (região apical da hifa), a divisão celular e a formação de diversos tipos celulares durante o ciclo de vida do fungo e permitindo a interação da célula com seu entorno.

A estrutura da parede celular de fungos é composta principalmente por glicoproteínas e polissacarídeos (quitina e glicana). As glicoproteínas presentes na parede celular são extensivamente modificadas em ambos *N*- e *O*-carboidratos, como também podem apresentar ancoramento na membrana mediado por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Bowman & Free, 2006). O estudo de

uma quitinase de *Aspergillus nidulans*, ChiA, glicosilada e ancorada por GPI, evidencia que esta proteína está especificamente localizada em sítios de germinação (antes e depois da germinação do conídio), em pontos de ramificação e no ápice das hifas. A expressão específica de ChiA foi demonstrada durante estágios iniciais do tubo germinativo e em regiões apicais das hifas. Sendo sugerido que o papel desta proteína pode ser remodelar a quitina da parede celular para manter uma estrutura mais frouxa nos sítios de germinação do conídio e nos pontos de ramificação das hifas, e como também pode estar envolvida na maturação da quitina recém sintetizada nas regiões apicais das hifas (Yamazaki *et al.*, 2008).

Foi também demonstrado o envolvimento da quitinase ChiB de *A. nidulans* com a autólise, pois a deleção deste gene não afetou a germinação nem a taxa de crescimento das hifas, no entanto reduziu consideravelmente a atividade intra e extracelular da quitinase. Ainda, por análises de *Western blot* foi detectado um aumento desta proteína na linhagem selvagem, sob condições de privação de fontes de carbono, uma condição que induziu a autólise da hifa. Isto sugere que ChiB participa do processo autolítico em *A. nidulans* (Yamazaki *et al.*, 2007). Além disso, ao contrário das linhagens mutantes $\Delta flbA$ e $\Delta ChiB$, que exibem um fenótipo predominante de autólise, a geração de duplo mutante $\Delta flbA\Delta ChiB$ resultou em um fenótipo com ausência de autólise por até 8 horas, em cultivos líquidos de *A. nidulans*. Já em cultivos em placas expostos ao ar, o mutante duplo apresentou fenótipo de autólise parcial, ao contrário da autólise completa que a colônia do mutante $\Delta flbA$ exibiu (Shin *et al.*, 2009).

Em *A. fumigatus*, ChiB1, uma quitinase de classe III (Fúngica/bacteriana), parece estar envolvida na degradação e reciclagem de quitina fúngica durante a autólise pois linhagens mutantes deste gene apresentaram um nível menor de atividade quitinolítica, em cultivos durante a fase de autólise, quando comparadas à linhagem selvagem. Entretanto, o mutante $\Delta ChiB1$ apresentou crescimento e morfogênese idênticos a linhagem selvagem em uma série de condições de cultivo testadas (Jaques *et al.*, 2003).

Recentemente, a deleção de uma família inteira de quitinases pertencentes à classe III (Fúngica/Vegetal), através da geração de mutantes, incluindo um

quíntuplo de *A. fumigatus*, demonstra um papel não essencial na morfogênese do fungo. Apesar da redução da atividade quitinolítica, não foram observados defeitos no crescimento e germinação destes mutantes quando comparados a linhagem selvagem. Uma leve diminuição do crescimento do mutante quántuplo durante a autólise sugere que quitinases da classe III podem desempenhar apenas um papel nutricional nessa fase do ciclo, retardando as mortes celulares (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2010).

Um repertório considerável de enzimas hidrolíticas é secretado por fungos micopatógenos, incluindo *Trichoderma*. Dentre estas enzimas, diversas quitinases já foram descritas atuando principalmente na degradação da parede celular do fungo-hospedeiro. A expressão do gene *ech42*, codifica uma endoquitinase de 42kDa, de *Trichoderma harzianum* foi fortemente induzida durante ensaios *in vitro* de confronto direto com o hospedeiro fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Carsolio *et al.*, 1994). Posteriormente, Carsolio *et al.*, (1999) demonstraram que não houve diferença significativa na patogenicidade de linhagens mutantes deletadas e superexpressando o gene *ech42* frente a *R. solani*, quando comparadas com a linhagem selvagem. Isto suporta a hipótese que a ação combinada de um conjunto de quitinases é necessária para a degradação eficiente da quitina presente na parede celular fúngica. Ainda, em *T. virens* a deleção ou a superexpressão deste mesmo gene (*ech42*) não afetou a taxa de crescimento, esporulação, produção antibiótica, e eficiência da colonização, no entanto foram evidenciadas alterações significativas na patogenicidade (redução e aumento, respectivamente) dessas linhagens mutantes frente a *R. solani*, quando comparadas à linhagem selvagem (Baek *et al.*, 1999).

Em *T. harzianum*, a expressão da endoquitinase Chit33, foi fracamente induzida durante o crescimento em cultivos contendo quitina e parede celular do hospedeiro *R. solani*. Entretanto, em ensaios de confronto direto esta enzima foi somente expressa durante, e não antes do crescimento sobre o hospedeiro (De las Mercedes Dana *et al.*, 2001). Estudos quantitativos mostram que a expressão do gene *ech30* de *T. atroviride* foi induzida em ensaios de confronto em placas, na presença do hospedeiro *Botrytis cinerea* (Klemsdal *et al.*, 2006). Além disso, transcritos dos genes *chi18-10* e *chi18-13* de *T. atroviride* foram altamente

expressos frente à parede celular e ensaios de confronto direto com o fitopatógeno *R. solani* (Seidl *et al.*, 2005).

A expressão da endoquitinase chit36 de *T. asperellum* (*T. harzianum* T-203) é regulada por ambos níveis de glicose e nitrogênio. Além disso, condições de estresse, presença de quitina coloidal ou N-acetilglicosamina são indutores efetivos da expressão deste gene. A proteína recombinante (chit36) de *T. asperellum* mostrou-se ativa contra diferentes fitopatógenos confirmando a importância desta endoquitinase na atividade micoparasítica de linhagens antagonistas de *Trichoderma* (Viterbo *et al.*, 2002).

Além das quitinases de *Trichoderma*, a endoquitinase (46kDa) codificada pelo gene chi46 de *Chaetomium globosum* apresentou atividade contra parede celular de diferentes fungos fitopatógenos. A expressão de chi46 foi responsiva em condições de exposição à parede celular de vários fitopatógenos, no entanto o maior nível de expressão ocorreu frente à parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2008). Da mesma maneira, a expressão do gene chi44 (uma endoquitinase do fungo *Stachybotrys elegans*) foi induzida (500 vezes) após 48 horas de tratamento com fragmentos de parede celular do fitopatógeno *R. solani* (Morissette *et al.*, 2006). Ainda, foram purificadas duas quitinases CHIT41 e CHIT32 do micopatógeno *Talaromyces flavus*, com os respectivos tamanhos 41 e 32kDa. Estas enzimas apresentaram tanto atividade contra parede celular dos fungos fitopatógenos *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*, como inibição da germinação do esporo e alongamento do tubo germinativo dos fungos *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme*, and *Magnaporthe grisea* (Duo-Chuan *et al.*, 2005).

Além das diversas quitinases de fungos fitopatógenos, muitos estudos de quitinases ortólogas em entomopatógenos também demonstram a forte participação desta classe de enzimas em interações patógeno-hospedeiro. Linhagens superexpressando a quitinase Bbchit1 aumentaram a virulência de *Beauveria bassiana* em bioensaios contra afídeos (Fang *et al.*, 2005). Posteriormente, utilizando este mesmo gene de quitinase foi construída outra linhagem superexpressando uma quitinase recombinante contendo um domínio de ligação a quitina do inseto *Bombix mori*. Essa quitinase apresentou maior

atividade na degradação de quitina, e também uma maior virulência em relação à proteína nativa (Fan *et al.*, 2006).

Estudos iniciais de uma quitinase (NrCHI) de *Nomuraea rileyi* revelaram uma alta similaridade (74%, 71% e 69%) com glicosil hidrolases da família 18 de *Metarhizium flavoviride*, *Aphanocladium album* and *M. anisopliae*, respectivamente. A expressão desta quitinase (NrCHI) apresentou atividade em meios contendo glicol quitina, no entanto, sua caracterização ainda está sendo investigada (Wattanalai *et al.*, 2004). E ainda, estudos de uma quitinase do fungo *Paecilomyces javanicus* PjChi-1 evidenciaram um aumento no nível de transcritos dessa quitinase em presença de quitina como substrato e a inibição do crescimento de diferentes hospedeiros fitopatógenos (Chen *et al.*, 2007).

4.1.2. Quitinases de *M. anisopliae*

Estudos em escala genômica demonstram uma enorme diversidade quanto ao número de quitinases em *M. anisopliae*. Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou 23 quitinases putativas no genoma de *M. anisopliae* da linhagem E6 (Junges, 2010). Da mesma maneira outros autores identificaram 30 e 21 quitinases putativas no genoma de *M. anisopliae* linhagem ASERF23, e de *M. acridum*, respectivamente (Gao *et al.*, 2011).

Entretanto, muito antes do sequenciamento do genoma de *M. anisopliae*, a atividade de quitinases de *M. anisopliae* em sobrenadantes de culturas que mimetizam infecção, já tinha sido descrita (St Leger *et al.*, 1986). Posteriormente duas quitinases com massas moleculares de 33 e 110kDa, e com atividade de endoquitinase e quitobiase, respectivamente, foram purificadas a partir de cultivos contendo quitina como único substrato (St Leger *et al.*, 1991a). Em sequência, foram identificadas isoformas de quitinases acídicas de *M. anisopliae*, através de zimogramas, sendo que uma destas proteínas com massa molecular de 43,5kDa revelou alta identidade com a quitinase (42kDa) de *Trichoderma harzianum*. E esta proteína foi imunolocalizada em estágios tardios da penetração, posterior à secreção de proteases (St Leger *et al.*, 1996a).

O gene referente a uma quitinase de 42kDa foi clonado e caracterizado pelo nosso grupo, sendo nomeada de *chit1* (Bogo *et al.*, 1998). Através de

análises da proteína recombinante, esta quitinase apresentou atividade de endoquitinase (Baratto *et al.*, 2003). Apesar de muitos estudos relacionados a esta quitinase (CHIT1 ou CHIT42), o estudo funcional deste gene em estágios de infecção, através da construção de transformantes com expressão constitutiva, se mostrou questionável, ou seja, a sua função no processo de infecção ainda não está completamente elucidada (Screen *et al.*, 2001). Outras quitinases de *Metarhizium anisopliae* foram identificadas em géis de atividade (zimogramas) contendo glicol quitina como substrato, onde foram observadas ao menos cinco bandas diferentes de possíveis quitinases, oriundas de sobrenadantes de cultivos sob condições que mimetizam o processo de infecção (Da Silva *et al.*, 2005). Além da quitinase CHIT1 outras duas quitinases de *M. anisopliae* linhagem E6 foram caracterizadas pelo nosso grupo.

A partir de cultivos contendo quitina como única fonte de carbono, nosso grupo de pesquisa purificou e caracterizou a primeira quitinase de *M. anisopliae* com atividade de endo-exo quitinase, com massa molecular de aproximadamente 30kDa, e sendo nomeada de CHIT30 (Pinto *et al.*, 1997). O gene *chi3* que codifica essa proteína de 30kDa foi isolado, e a endo-exo-quitinase correspondente foi detectada, através de ensaios de imuno-histoquímica, apenas em presença de fontes indutoras como quitina, cutícula de carrapato e em baixas concentrações de N-acetilglicosamina. No entanto, foram detectados maiores níveis desta quitinase acumulados após 48 horas de infecção em cutícula de *B. microplus* sugerindo que a produção da CHIT30, como na CHIT42, é dependente da acessibilidade de seu substrato (Da Silva *et al.*, 2005).

O gene *Chi2* foi isolado e caracterizado, e a expressão deste gene apresentou regulação positiva em cultivos contendo quitina, cutícula de carrapato e N-acetilglicosamina; no entanto, na presença de glicose este gene apresentou regulação negativa (Baratto *et al.*, 2006). O estudo funcional de alguns genes de quitinases possibilitou elucidar alguns papéis que estas proteínas têm no ciclo de vida e de infecção de *M. anisopliae*. Boldo *et al.*, (2009) mostraram que linhagens superexpressando o gene *chi2* foram mais virulentas frente ao inseto-hospedeiro *D. peruvianus*, do que o tipo selvagem. Ao contrário, mutantes inativados para este gene apresentaram virulência reduzida, dessa forma confirmando a

importância deste gene no processo de infecção. Já em linhagens mutantes deletadas para o gene *chi3* apresentaram menor virulência em bioensaios contra *D. peruvianus*, no entanto, a superexpressão deste gene foi letal para o fungo. E estas linhagens mutantes não apresentaram alterações morfológicas (Staats *et al.*, 2007, Staats, 2007).

Outro fator que adiciona complexidade a este sistema biológico é a regulação pós-transcricional, pois um padrão de processamento diferencial do transcrito de *chi2* foi caracterizado pela remoção ou retenção do segundo intron, sugerindo funções biológicas distintas para cada proteína produzida. Sendo este o primeiro estudo reportando a ocorrência de *splicing* alternativo em *M. anisopliae* (Boldo *et al.*, 2010). Um padrão similar de processamento foi detectado nos genes *chi18-3* e *chi18-13* do fungo ortólogo *H. jecorina*, no entanto ainda não foi elucidado (Seidl *et al.*, 2005) . Contudo, a diversidade tanto em número de quitinases quanto em sua regulação demonstra ainda mais a complexidade desta classe de proteínas neste sistema biológico.

4.2. OBJETIVO

Avaliar o perfil transcricional de 23 quitinases de *M. anisopliae* (20 quitinases putativas e 3 quitinases já caracterizadas) nos estágios de diferenciação celular de apressório, crescimento vegetativo (hifas) e blastosporos.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Indução *in vitro* de apressório e blastosporos

As induções dos diferentes tipos de diferenciação celular por *M. anisopliae* foram procedidas conforme a otimização demonstrada no item 3.3.5.

4.3.2. Preparação das amostras, extração de RNA total e síntese de cDNA

A preparação e armazenamento das amostras dos três tipos celulares foram procedidos de acordo com o item 3.3.6., e o extração e síntese de cDNA conforme o item 3.3.7.

4.3.3. Detecção de transcritos de quitinases por RT-PCR

O cDNA oriundo das três condições de diferenciação celular [apressório (16 horas), crescimento vegetativo (24 horas) e blastosporos (64 horas)] foi utilizado como molde para efetuar a detecção de 23 genes que codificam quitinases, por PCR. Os oligonucleotídeos para os genes de quitinases foram elaborados a partir de regiões que flanqueiam éxons. As sequências dos oligonucleotídeos, as temperaturas anelamento, tempo de extensão utilizados nas reações de PCR, e o tamanho do amplicon de cada gene são mostrados na Tabela 4. O DNA genômico de *Metarhizium anisopliae* linhagem E6 foi utilizado como controle positivo das reações de PCR. Todos os produtos de amplificação foram migrados em gel de agarose 1 – 1,5% contendo Gelred como corante fluorescente de ácidos nucléicos e foram fotografados através do software Quantity one.

Tabela 4 – Condições das reações de PCR utilizadas para detectar transcritos de quitinasases.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Temperatura de Anelamento	Tempo de Extensão	Tamanho do amplicon Genômico	Tamanho do amplicon cDNA
ChiMaA1F	atg ccg tcg tta ttt gct cag tc	58,5°C	1min	652pb	402pb
ChiMaA1R	cca cgt cca ccc tcc aat aga				
ChiMaA2F	atg agc tcc cat tct cgt ccg	59°C	1min 30s	1221pb	980pb
ChiMaA2R	tta gga tgt gtg taa cgc acg aaa gc				
ChiMaA3F	gaa att tca cca cga aac gaa ggt cat	58,5°C	1min	470pb	358pb
ChiMaA3R	cgc ctg ttc aac aag tca tag gtc a				
ChiMaA4F	atg agt aac gac ggg tac cga ac	58,5°C	1min	435pb	322pb
ChiMaA4R	tct tga aat tgg cac tgt agg tcc				
ChiMaA5F	atg cgt tca tgc atg ttt ctg	57°C	1min 30s	1308pb	1109pb
ChiMaA5R	tca cag tga ctt gac gcc agc ttg				
ChiMaA6F	atg ccg tct ctc ttc gct tc	57°C	1min 30s	571pb	373pb
ChiMaA6R	cga tgg aga tga gca gct tca				
ChiMaA7F	atg acc gca ttt gcc ccg tca acg gcc ttc	69°C	1min	604pb	489pb
ChiMaA7R	gtc tcg gcg att cat taa atc gta g				
ChiMaA8F	atg gcg ccg ctc ctc cac acg	66°C	1min	1038pb	1038pb
ChiMaA8R	tca gag ccg ccc ctt gac gtt g				
ChiMaA9F	atg cgt ttc gaa tca aca ctc tg	56°C	1min 30s	1188pb	1188pb
ChiMaA9R	tca ctt gga ccc aaa ctt ctt g				
ChiMaB1F	ggc ggc ggt acg atc gaa aat aac	57°C	1min 40s	1378pb	1094pb
ChiMaB1R	aca cat tgg taa ggg gga AC				
ChiMaB2F	gca gct ccc tcg tga agt cca t	60,5°C	1min	471pb	414pb
ChiMaB2R	tgt tgc agt tgc cgt tgt tg				
ChiMaB3F	atg tct tct tct ttc tgg tct ttg gc	58,0°C	1min	691pb	371pb
ChiMaB3R	gtt gca cca ccg agt gac aag AC				
ChiMaB4F	atg acg ttt ccc gtc cag ac	57°C	1min 10s	592pb	416pb
ChiMaB4R	ccg cca aga gag aga atg att g				
ChiMaB5F	atg gga caa cag agc gtc gcc tac	60,5°C	1min	921pb	921pb
ChiMaB5R	tta gca aat ctt acc att tgt c				
ChiMaB6F	atg ccc tcc ttc agc acc ttc	59,0°C	1min 30s	1023pb	1023pb
ChiMaB6R	cta gca agc gct cgc atc aac				
ChiMaB7F	atg tct ttg tca tta ggt ctt g	57°C	1min	905pb	762pb
ChiMaB7R	aca gct tgg cgt tct tgc tct				
ChiMaC1F	ttc gga cga ctt ctg tat tga atc c	57°C	3min 20s	3076pb	2837pb
ChiMaC1R	tca gac cga ttg gct gca ttt c				

ChiMaC2F	atg cgg cag tgt acg ctg tg	57°C	4min 20s	4076pb	3268pb
ChiMaC2R	ctc cat cat tat cgt cgt cg				
ChiMaC3F	cct tca ttt aaa ggc aaa gca tgc	56,5°C	1min 20s	1013pb	757pb
ChiMaC3R	tgt acg gga tcc tgt aaa gcg a				
ChiMaC4F	atg aag gct ctt gtg gcc ttc AC	59,5°C	3min 30s	3112pb	2799pb
ChiMaC4R	cag cca gtt tcg gtt tga tgg atc				
ChiMaD1F	atg gcg ccg ctc ctc cac AC	66°C	1min 20s	1038pb	1038pb
ChiMaD1R	tca gag ccg ccc ctt gac gtt g				
ChiMaD2F	atg cca ccc ata ccg ccg cac	61°C	1min 20s	1017pb	1017pb
ChiMaD2R	cta ttc gtg gtg tgt gcc atc				
ChiMaD3F	atg ttc aga tca tta tat ttg ctc	57,1°C	1min 10s	978pb	978pb
ChiMaD3R	tta tat gcc gcc gcc aag ttg				

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Análise transcricional de quitinases em diferentes tipos celulares produzidos por *M. anisopliae*

Em uma abordagem global, através de estudos de biomineração em escala genômica por nosso grupo de pesquisa, revelou 23 quitinases putativas no genoma de *M. anisopliae*, das quais 3 experimentalmente já caracterizadas (Junges, 2010). Apesar desta grande quantidade de informações (*in silico*) sobre as quitinases encontradas no genoma de *M. anisopliae*, são necessárias comprovações experimentais das mesmas. Por isso, com o intuito de validar estas quitinases encontradas no genoma de *M. anisopliae* e tentar atribuir função a cada uma delas, foi realizada uma análise transcricional das quitinases de *Metarhizium* em diferentes condições de diferenciação celular (formação de apressório, crescimento vegetativo e blastosporos).

A partir dessas reações de detecção pôde ser observado que todas as 9 populações de transcritos de quitinases, preditas *in silico*, pertencentes ao subgrupo A foram detectadas em ao menos uma das condições de diferenciação celular (apressório, crescimento vegetativo e blastosporos), com exceção do gene *chimaA7* que não apresentou transcritos em nenhuma das condições (Figura 18). O gene *chimaA1* que codifica a quitinase CHIT42, anteriormente caracterizado por nosso grupo de pesquisa, apresentou uma população de transcritos com o tamanho de 402pb somente nas condições de crescimento vegetativo e formação de blastosporos, não apresentando transcritos na condição de diferenciação a apressório. O gene *chimaA2* apresentou transcritos com o tamanho de 980pb em todas as condições de diferenciação celular, no entanto, na condição de crescimento vegetativo ocorreu a amplificação de uma segunda população de transcritos com um tamanho maior em comparação a primeira (aproximadamente 1060pb). Esta população de transcritos possivelmente pode ser produto do processamento diferencial do *splicing* (Boldo *et al.*, 2010), porém a ocorrência de tal fenômeno deve ser melhor avaliada por outras metodologias. Os genes *chimaA3*, *chimaA4*, *chimaA6* e *chimaA9* apresentaram populações de transcritos com os respectivos tamanhos de 358pb, 322pb, 373pb, 1188pb, assim como nas

predições *in silico*, estes estão presentes em todas as condições de diferenciação celular.

As quitinases codificadas pelos genes *chimaA8* e *chimaA9*, caracterizadas pela ausência de íntrons apresentaram transcritos de tamanhos referente às predições *in silico* com 1038pb e 1188pb, respectivamente (Figura 18). O gene *chimaA8* apresentou transcritos somente na condição de diferenciação em apressório enquanto que o gene *chimaA9* apresentou transcritos em todas as condições de diferenciação celular. E por fim, a quitinase codificada pelo gene *chimaA5*, apresentou uma população de transcritos com o tamanho de 1109pb tanto na condição de crescimento vegetativo como em blastosporos, porém, esta é ausente na condição de diferenciação a apressório.

Nas quitinases do subgrupo B pôde ser observado um padrão de distribuição variado de transcritos presentes nos diferentes tipos celulares de *Metarhizium*, pois apenas transcritos de dois genes estão presentes em todas as condições de diferenciação celular (Figura 19). A população de transcritos do gene *chimaB7* está presente em todas as condições de diferenciação celular com um tamanho de 762pb. E o gene *chimaB2* (originalmente caracterizado por nosso grupo como *chi3*) apresentou duas espécies de transcritos, a primeira com um tamanho de 414pb presente em todas as condições de diferenciação celular, e a segunda com um tamanho de aproximadamente 470pb, presente apenas em apressório e crescimento vegetativo. Esta segunda espécie de transcritos de *chimaB2*, assim como ocorreu na quitinase *chimaA2*, possivelmente podem ser produto do processamento diferencial do *splicing*, como a retenção de intron. A população de transcritos dos genes *chimaB1* (*chi2*- caracterizado experimentalmente por nosso grupo) e *chimaB4* estão presentes somente na condição de diferenciação a blastosporos apresentando um tamanho de 1094pb e 416pb, respectivamente. Sendo estas proteínas caracterizadas por apresentar o domínio de ligação à celulose. Na *chimaB3* não foi detectada nenhuma população de transcritos, sendo apenas detectado o gene no genoma de *Metarhizium*. Os genes *chimaB5* (921pb) e *chimaB6* (1023pb) não apresentam íntrons, espécies de transcritos destes genes foram detectadas em condições de diferenciação a

apressório, blastosporos; e de crescimento vegetativo, blastosporos, respectivamente.

Os genes que codificam quitinases do subgrupo C foram detectados no genoma de *Metarhizium*; no entanto nas condições de diferenciação celular propostas não foram detectados transcritos de nenhum dos 4 genes (Figura 20). Tanto as quitinases pertencentes ao subgrupo C como ao D (proposto recentemente por nosso grupo) não apresentam quitinases já estudadas anteriormente. Diferentemente das quitinases do subgrupo C, as do subgrupo D (caracterizados pela ausência de íntrons e de domínios funcionais) apresentaram populações de transcritos oriundos do gene *chimaD1* (1038pb) na condição de diferenciação a apressório; e do gene *chimaD2* (1017pb) em crescimento vegetativo e formação de blastosporos. Transcritos do gene *chimaD3* não foram detectados em nenhuma das condições (Figura 21).

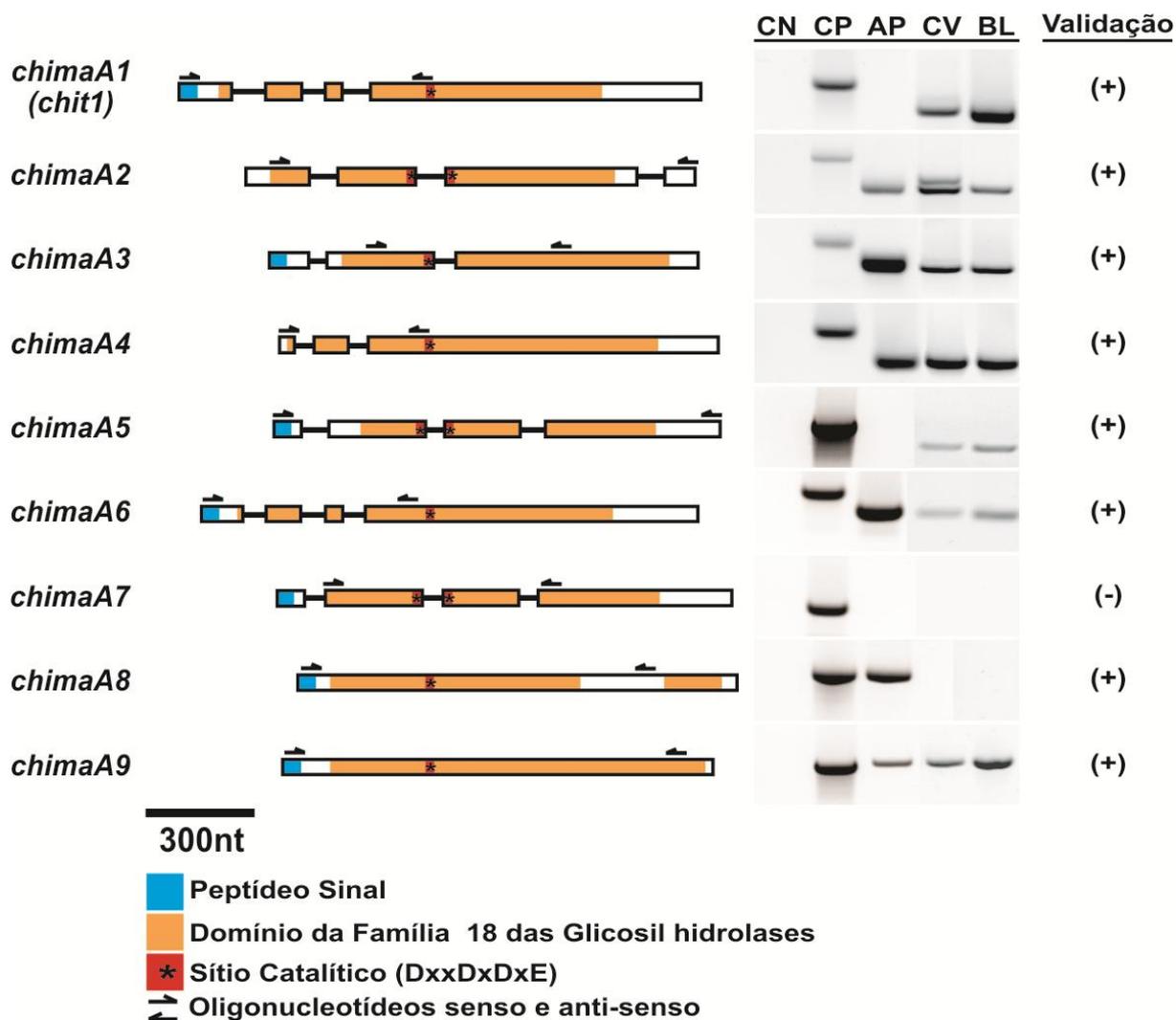


Figura 18 – Estrutura de domínios e análise transcricional de quitinases do subgrupo A em diferentes condições de diferenciação celular de *M. anisopliae*. CN: controle negativo; CP: controle positivo; AP: apressório; CV: crescimento vegetativo; BL: blastosporos; (+): presença de transcritos; (-): ausência de transcritos.

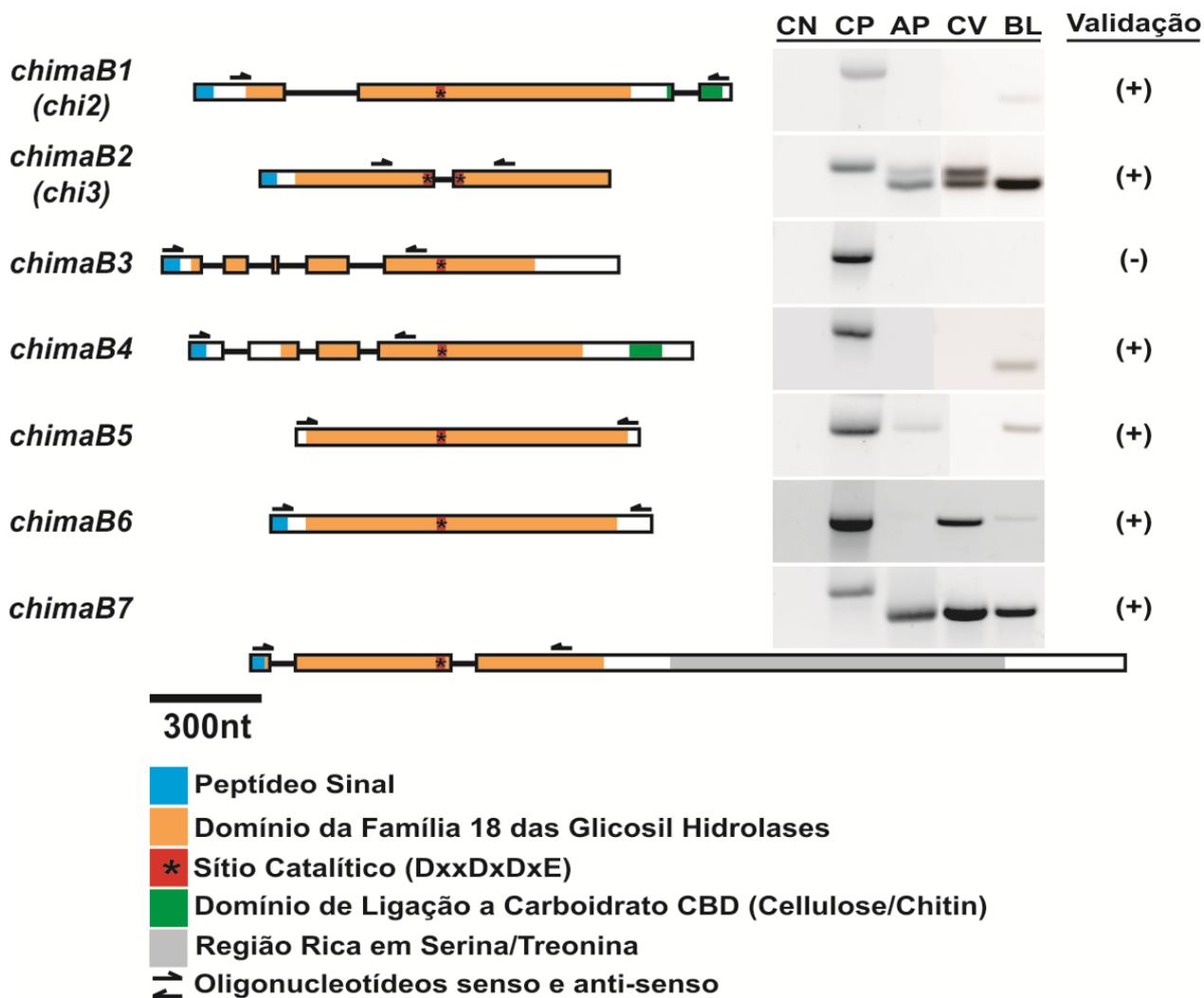


Figura 19 – Estrutura de domínios e análise transcricional de quitinases do subgrupo B em diferentes condições de diferenciação celular de *M. anisopliae*. CN: controle negativo; CP: controle positivo; AP: apressório; CV: crescimento vegetativo; BL: blastosporos; (+): presença de transcritos; (-): ausência de transcritos.

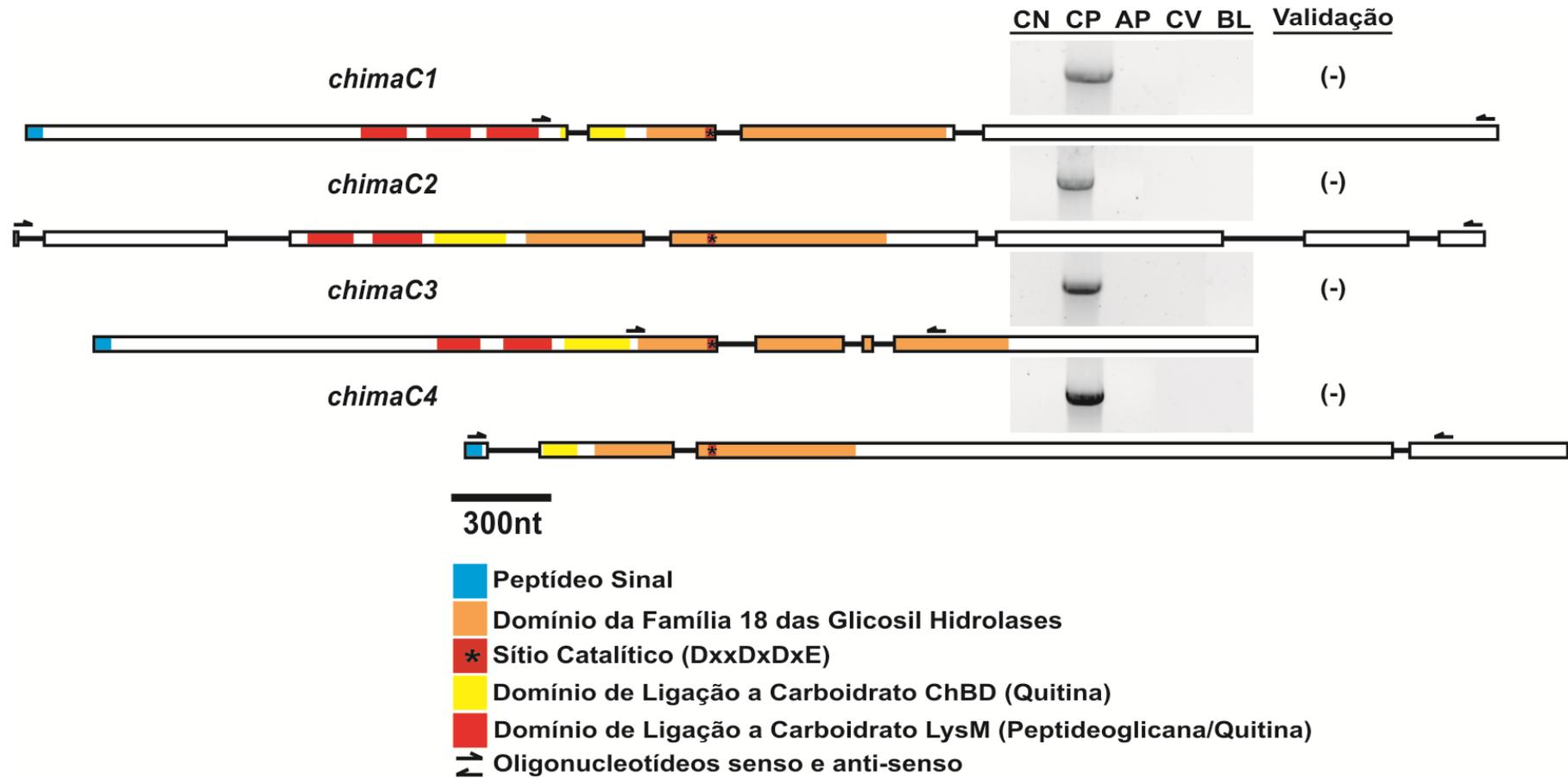


Figura 20 – Estrutura de domínios e análise transcricional de quitinases do subgrupo C em diferentes condições de diferenciação celular de *M. anisopliae*. CN: controle negativo; CP: controle positivo; AP: apressório; CV: crescimento vegetativo; BL: blastosporos; (+): presença de transcritos; (-): ausência de transcritos.

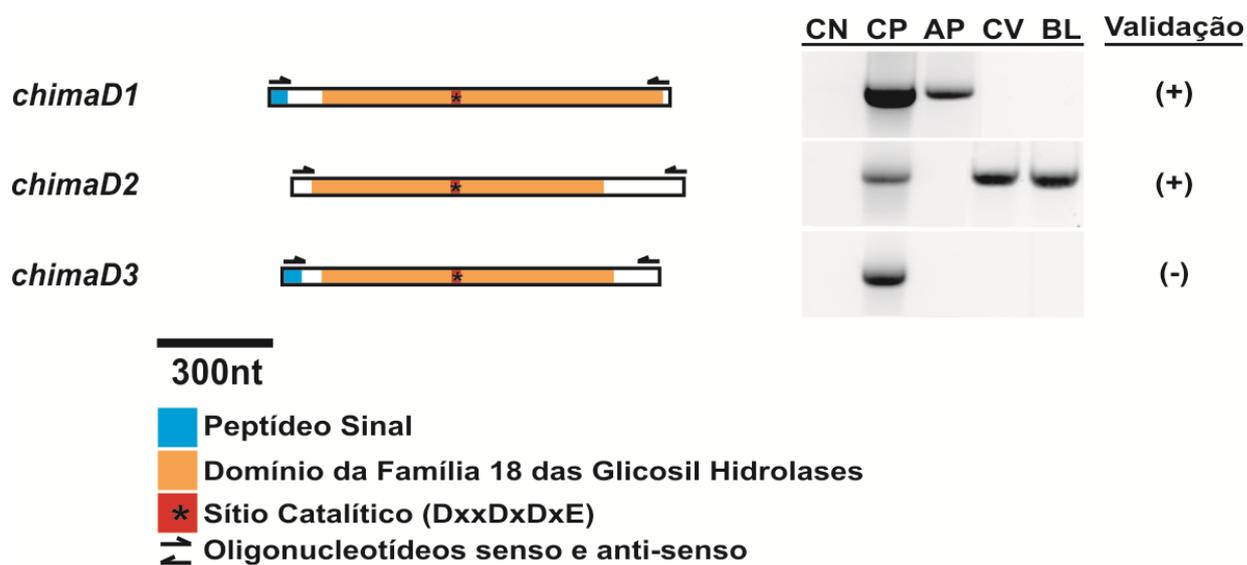


Figura 21 – Estrutura de domínios e análise transcricional de quitinases do subgrupo D em diferentes condições de diferenciação celular de *M. anisopliae*. CN: controle negativo; CP: controle positivo; AP: apressório; CV: crescimento vegetativo; BL: blastosporos; (+): presença de transcritos; (-): ausência de transcritos.

4.5. DISCUSSÃO

Com o objetivo de caracterizar as quitinases do entomopatógeno *M. anisopliae* foi realizada uma ampla busca no genoma do fungo por esta classe de proteínas (Junges, 2010), e no presente estudo foi efetuada a primeira tentativa de validar experimentalmente estas quitinases putativas. Como as quitinases são provavelmente reguladas positivamente e podem ser expressas apenas em estágios de desenvolvimento específicos do fungo, foram utilizados diferentes tipos celulares (apressório, crescimento vegetativo e blastosporos) para verificar transcritos de quitinases. A obtenção dos diferentes tipos celulares foi otimizada e utilizada nas análises transcricionais para o estudo de genes putativos de quitinases de *M. anisopliae*.

A pesquisa de transcritos de quitinases putativas em *M. anisopliae* pode fornecer indicativos para compreender as possíveis funções destes genes durante as fases de pré e pós-penetração. Neste estudo, observamos a presença de transcritos de quitinases do subgrupo A em todos os estágios de diferenciação celular do fungo analisado. Oito das nove quitinases putativas do subgrupo A, foram validadas pela detecção de seus transcritos por RT-PCR. Transcritos de *chimaA7* não foram detectados nos tipos celulares analisados, no entanto a funcionalidade deste gene, em alguma fase do ciclo de vida ou de infecção do fungo, não pode ser descartada. A falha na detecção de algumas quitinases pode ser explicada possivelmente devido à baixas quantidades de transcritos que não foram representativas para a detecção, ou provavelmente os tipos celulares utilizados neste estudo não induzem a expressão de alguns genes de quitinases, portanto pode ser dependente das condições de diferenciação celular.

Transcritos do gene *chimaA1* (originalmente descrito por Bogo *et al.* (1998) como *chit1* que codifica uma proteína com 42kDa, quitinase CHIT42) estão presentes em estágios tardios de diferenciação celular na fase de penetração e nos estágios posteriores da penetração como crescimento vegetativo e formação de blastosporos. Estudos anteriores sugerem que a função de quitinases pertencentes ao sugrupo A (antes descrito como classe V) está associada à morfogênese, sem envolvimento na aquisição de nutrientes

pela degradação de quitina exógena (Hamel *et al.*, 1997, Fukamizo, 2000, Jaques *et al.*, 2003).

St Leger *et al.*, (1996a) detectaram por imunolocalização a presença de uma quitinase, com massa molecular de 42kDa, em estágios tardios da penetração (após secreção de proteases), e nas estruturas de apressórios esta proteína apresentou um nível de expressão basal, o que sugere um papel na liberação de indutores de quitinases através da quitina quando esta está acessível. Esses estudos podem explicar a ausência de transcritos de *chimaA1* em eventos de formação do apressório. Linhagens mutantes de *M. anisopliae* superexpressando CHIT1 não apresentaram aumento na virulência frente às lagartas de *Manduca sexta*. Entretanto, o elevado nível de atividade quitinolítica permitiu uma degradação de quitina mais prematura do que o normal, quando comparado ao tipo selvagem (Screen *et al.*, 2001). Estes autores sugerem um modo de regulação que não é limitante para a penetração na cutícula.

Uma abordagem funcional diferente demonstrou que plantas de *Tobacco* expressando altos níveis de CHIT42 (superexpressão de *chit1*) de *M. anisopliae* foram consistentemente resistentes a *Rhizoctonia solani*, reduzindo lesões foliares causadas pelo fitopatógeno (Kern *et al.*, 2009). Além disso, uma pesquisa de transcritos de quitinases, no fitopatógeno *Hypocrea jecorina*, demonstrou que o gene ortólogo *chi18-5* (*chimaA1* em *M. anisopliae*) apresenta um nível transcricional mais evidente quando o fitopatógeno é cultivado na ausência de seu hospedeiro (Seidl *et al.*, 2005). Assim, *chimaA1* que é conservado em todos ascomicetos, provavelmente tem uma importante função associada à morfogênese.

Uma quitinase de *Aspergillus nidulans* ChiB (classe V), que é filogeneticamente mais próxima a ChimaA1 e ChimaA4 (69% e 74% de similaridade, respectivamente), parece ter uma potencial participação na autólise. Linhagens mutantes deletadas para *ChiB* não apresentaram morfologia alterada, no entanto, foi observada uma redução considerável nas atividades quitinolíticas intra e extracelulares. Durante a fase de autólise as linhagens mutantes Δ *ChiB* apresentaram uma redução mais lenta no peso seco de hifas em comparação ao tipo selvagem, o que pode indicar um possível papel na autólise. Ainda, estes autores detectaram por análises de *Western*

Blot, uma quantidade aumentada desta quitinase (ChiB) secretada pelo tipo selvagem em condições de privação de fontes de carbono, confirmando a sua função nesta fase de diferenciação celular (Yamazaki *et al.*, 2007, Shin *et al.*, 2009). A grande similaridade de sequências entre as quitinases de *A. nidulans* (ChiB) e de *M. anisopliae* (ChimaA4), pode indicar função gênica similar em *M. anisopliae*, pois nosso grupo de pesquisa detectou transcritos de *chimaA4* em cultivos de *M. anisopliae* linhagem E6 no processo de autólise (não publicado).

Além disso, transcritos dos genes putativos *chimaA2*, *A3*, *A4*, *A6* and *A9* foram detectados nos três tipos celulares testados (apressório, crescimento vegetativo e blastosporos). Análises transcriptômicas comparativas demonstraram que o gene que codifica a quitinase GH18(7) de *M. anisopliae* ARSEF23 (Gao *et al.*, 2011) (homólogo a *chimaA4* de *M. anisopliae* linhagem E6) é regulado negativamente em presença de asas do hospedeiro. Por outro lado, os genes que codificam as quitinases GH18(3) e (4) (homólogos a *chimaA2* e *A3*, respectivamente) foram regulados positivamente sob as mesmas condições de cultivo (Gao *et al.*, 2011). Os genes das quitinases de *H. jecorina* (*chi18-3* e *chi18-4*, genes ortólogos) foram expressos constitutivamente, embora seus transcritos variarem em algum grau sob as diferentes condições de cultivo testadas (Seild *et al.*, 2005). Apesar dos resultados demonstrarem a detecção destas quitinases (*chimaA2* e *A3*) de *M. anisopliae* tanto em condições *in vitro* de crescimento vegetativo e como em condições *in vitro* que mimetizam infecção no hospedeiro (apressório e blastosporos), é possível que a regulação destes genes possa variar em algum grau dentre os diferentes tipos celulares testados. Transcritos de *chimaA5* estão presentes apenas em eventos de pós-penetração (crescimento vegetativo e blastosporos), no entanto, Gao *et al.*, (2011) observou uma expressão constitutiva do gene homólogo GH18(11) durante a penetração em asas de *Periplaneta americana*.

Durante nossos estudos, observamos mais de uma espécie de mRNA com provável retenção do íntron em *chimaA2* (na condição de crescimento vegetativo) e em *chimaB2* (*chi3*) (na condição de crescimento vegetativo e formação de apressório). Similarmente Seidl *et al.*, (2005) observaram um padrão similar de bandas em dois genes de quitinases em diferentes condições

de cultivo, *chi18-3* e *chi18-13* de *H. jecorina* que são filogeneticamente próximos de *chimaA2* (86% similaridade) e *chimaB2* (83%similaridade), no entanto não foi evidenciado quaisquer tipo de processamento diferencial do mRNA. Por outro lado, a presença de processamento diferencial do mRNA tem sido reportada em *M. anisopliae* (Boldo *et al.*, 2010) e também em outros organismos (Ebbole *et al.*, 2004). A evidência de *splicing* alternativo pela retenção de íntrons nos transcritos de *chimaB1* (*chi2*) em meios de cultivo contendo quitina cristalina como única fonte de carbono sob diferentes tempos de cultivo foi verificada em *M. anisopliae* por Boldo *et al.*, (2010).

Apesar desse padrão de processamento diferencial de *chimaB1* observado por Boldo *et al.*, (2010), em nossas análises foi observada a presença de transcritos de *chimaB1* com um padrão normal de *splicing* na condição de formação de blastosporos. Isto reforça ainda mais a teoria de que o padrão de transcritos com *splicing* alternativo pode ser dependente das condições de cultivo, podendo induzir ou não a ocorrência deste fenômeno (Seidl *et al.*, 2005; Boldo *et al.*, 2010). Mesmo que esse padrão de processamento de mRNA em transcritos de *chimaA2* e *chimaB2* indique um possível mecanismo pós-transcricional por *splicing* diferencial, confirmações experimentais são necessárias.

Estudos funcionais demonstraram a influência de *chi2* na patogênese de *M. anisopliae*, pela construção de mutantes nulos, que apresentaram virulência diminuída quando comparados ao tipo selvagem (Boldo *et al.*, 2009). O gene *chimaB2* (*chi3* que codifica uma proteína com 30kDa, CHIT30) já descrita por Da Silva *et al.* (2005) foi identificada na presença de fontes indutoras como quitina, cutícula de carrapato e baixas concentrações de N-acetilglicosamina. Estudos funcionais, pela construção de mutantes nulos ($\Delta chi3$), revelaram virulência reduzida contra o inseto hospedeiro *Dysdercus peruvianus* em comparação ao tipo selvagem de *M. anisopliae*. Entretanto, linhagens superexpressando este gene foram letais para o fungo (Staats, 2007). O gene *chimaB2* (*chi3*) parece ter um papel importante na virulência, e ainda na formação de estruturas especializadas como apressório e blastosporos (produzidas durante a infecção por *M. anisopliae*).

As quitinases ChimaB3 e B4 são filogeneticamente relacionadas entre si, e ambas apresentaram relação filogenética com genes ortólogos de *H. jecorina* (*chi18-12*) e de *H. lixii* (Chit33). Alguns estudos associam essas quitinases de *Hypocrea* à papéis nutricionais (saprofítico ou micoparasítico), que são reprimidos por glicose e por condições de privação nutricional, os autores sugerem que funções dessas quitinases podem ser específicas para cada espécie (Limon *et al.*, 1995, Kim *et al.*, 2002, Seidl *et al.*, 2005). A ausência de transcritos de *chimaB3* tanto em apressório (condições de baixas concentrações de fontes nitrogenadas) como em crescimento vegetativo e blastosporos (condições de altas concentrações de glicose), e a presença de transcritos de *chimaB4* apenas em condições de formação de blastosporos, pode sugerir que a regulação destes genes provavelmente é ativada por condições de cultivo específicas.

Transcritos de *chimaB5* e *B6* estão presentes nas condições de apressório, blastosporos; e crescimento vegetativo, blastosporos, respectivamente. Apesar destes genes de quitinases de *M. anisopliae* apresentarem proximidade filogenética aos genes *chi18-14* e *18-16* de *H. jecorina* que são associados ao micoparasitismo e biocontrole (Seidl *et al.*, 2005), análises por microarranjo destes genes em *M. anisopliae* ARSEF23 demonstraram expressão constitutiva sob condições de interação com inseto hospedeiro (asas de *P. americana*) (Gao *et al.*, 2011). Nossas análises mostraram transcritos de *chimaB7* presentes em todos os tipos celulares de *M. anisopliae* linhagem E6 testados, no entanto este gene na linhagem ARSEF23 de *M. anisopliae* (*chi18-18*) apresentou expressão regulada negativamente sob condições de infecção sobre asas de inseto (Gao *et al.*, 2011), reforçando a influência de condições específicas de cultivo na expressão gênica.

Alcazar-Fuoli *et al.*, (2010) estudaram o papel funcional pela deleção de uma família inteira de quitinases do tipo fúngicas/planta, classe III (subgrupo B) de *Aspergillus fumigatus* (homólogas às *chimaBs* de *M. anisopliae*). Um mutante quártuplo (Δ *chi1:chi2:chi3:chi4:chi5*) de *A. fumigatus* não apresentou defeitos no crescimento ou na germinação, mesmo apresentando uma baixa taxa de atividade quitinolítica em relação ao tipo selvagem. Baseado nestes estudos funcionais, estes autores sugerem que as quitinases do subgrupo B

não são essenciais na morfogênese do fungo, embora possam desempenhar um papel nutricional durante a autólise, devido a uma sutil redução do crescimento fúngico durante esta fase do ciclo.

Em nosso trabalho, transcritos de quitinases do subgrupo C não foram detectados nos tipos celulares testados. Entretanto, estudos de genes que codificam quitinases ortólogas em organismos como *H. jecorina* (Gruber *et al.*, 2010) demonstraram a indução da expressão de genes do subgrupo C no micoparasitismo contra um hospedeiro específico. Isto sugere o envolvimento não somente em micoparasitismo, mas também apresenta diferentes funções no ciclo de vida do fungo. Além disso, em análises por microarranjo de GH18(9) de *M. anisopliae* ARSEF23 (homóloga a *chimaC3* de *M. anisopliae* E6), foi observada uma expressão constitutiva deste gene em condições de infecção sobre asas de inseto (Gao *et al.*, 2011).

Os genes de quitinases de *M. anisopliae* pertencentes ao novo subgrupo (D), proposto por Junges (2010), são caracterizadas principalmente pela ausência de íntrons. E este subgrupo é composto por três genes (*chimaD1*, *D2*, *D3*). Transcritos de *chimaD1* estão presentes somente em condições de formação de apressório (privação de fontes nitrogenadas), e *chimaD2* em condições de crescimento vegetativo e blastoporos (altas concentrações de solutos). Entretanto, nenhum transcrito de *chimaD3* está presente nos tipos celulares testados. Estes dados podem sugerir uma dependência das condições de cultivo, que podem induzir ou não a expressão gênica, como observado por Seidl *et al.*, (2005). Quitinases ortólogas do novo subgrupo (D) também estão representadas em diversos fungos, tais como *H. jecorina* (Chi18-15), *H. lixii* (Chit36Y) e *Beauveria bassiana* (BbChit1), sendo estas filogeneticamente relacionadas à ChimaD1 de *M. anisopliae* (Viterbo *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2005; Seidl *et al.*, 2005).

Estudos anteriores evidenciam que a expressão do gene *chit36Y* de *H. lixii* é induzida por diversas condições, tais como quitina e seus monômeros, privação de nitrogênio e condições de estresse (variação de temperatura e desequilíbrio osmótico) (Viterbo *et al.*, 2002). Além disso, linhagens mutantes de *B. bassiana* superexpressando o gene ortólogo *Bbchit1* apresentaram uma

maior virulência contra afídios, em comparação ao tipo selvagem (Fang *et al.*, 2005b).

Através da pesquisa de transcritos nos diferentes tipos celulares de *M. anisopliae* produzidos durante a infecção, propostos neste estudo, foi possível validar 16 quitinases putativas, incluindo as quitinases já caracterizadas. Ainda, o perfil transcricional qualitativo pôde nos fornecer indícios em relação à diversidade funcional das quitinases de *Metarhizium* que podem apresentar funções específicas e diversas neste organismo. Apesar disso, são necessários mais estudos para elucidar o papel de cada proteína e suas diversas funções no ciclo de vida e de infecção de *M. anisopliae*.

4.6. PERSPECTIVAS

Quantificar o nível de expressão de 23 quitinases putativas por qPCR nos tipos celulares de apressório, hifas e blastosporos. E adicionar a estas análises outras condições de cultivo como autólise, condições indutoras da expressão de quitinases como monômeros de quitina, N-acetilglicosamina, e fontes repressoras como glicose.

Realizar o estudo funcional das quitinases putativas pela geração de linhagens mutantes (deleção para mais de um gene ou superexpressão) por mutagênese insercional utilizando a metodologia de agrotransformação.

Confirmar a possibilidade de ocorrência de modificações pós-transcricionais de *chimaA2* e *chimaB2* por sondas de hibridização, e analisar a funcionalidade de tais proteínas através de superexpressão e identificação por MS/MS.

5. CONCLUSÕES

O rendimento máximo de conídios de *M. anisopliae* diferenciados em apressório foi de aproximadamente 60% no período de 16 horas, em experimentos realizados em maior escala;

A produção de blastosporos por *M. anisopliae* atingiu um rendimento de 10^8 blastosporos.mL⁻¹ em um período de 64 horas de incubação.

O perfil transcricional de *emp1* foi mais evidente na condição de apressório quando comparado às condições de crescimento vegetativo e blastosporos, indicando uma potencial função desse gene no processo de diferenciação a apressório.

A agrotransformação de *M. anisopliae* permitiu o isolamento de 216 colônias fúngicas resistentes a glifosinato de amônio. A frequência de transformação observada foi superior a 60%, porém em apenas 1,5% dos transformates parecem ter recombinação homóloga;

Através do RT-PCR, foi possível validar 16 genes putativos de quitinases incluindo os já caracterizados, do genoma de *M. anisopliae*. E isto, também inclui a validação de dois genes que codificam quitinases putativas do novo subgrupo proposto (D);

Com as análises qualitativas do perfil transcricional de diferentes genes de quitinases, foi possível perceber a correlação entre a dependência de condições de cultivo específicas (diferentes tipos celulares) e a expressão dos genes de quitinases;

O gene *chimaA1*, anteriormente caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa, com função relacionada a morfogênese, parece ter também um papel funcional associado às etapas posteriores à penetração;

O gene *chimaA4* parece ter um função mais relacionada ao processo de autólise, no entanto também parece participar na diferenciação de estruturas especializadas como apressório e blastosporos.

A detecção de mais de uma espécie de mRNA nos genes *chimaA2* e *chimaB2* pode indicar que exista uma provável regulação pós-transcricional pela retenção de introns.

A não detecção de transcritos de alguns genes de quitinases pode ser explicada pela quantidade não representativa de transcritos produzidos pelo gene, ou provavelmente pela não indução da expressão do gene devido aos tipos celulares testados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, J. P., R. I. Samuels, I. R. Machado & C. Dolinski, (2007) Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). In: *J Invertebr Pathol. United States*, pp. 187-192.
- Adams, D. J., (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**: 2029-2035.
- Ahearn, D., D. Price, R. Simmons, A. Mayo, S. Zhang & S. Crow Jr, (2007) Microcycle conidiation and medusa head conidiophores of aspergilli on indoor construction materials and air filters from hospitals. *Mycologia* **99**: 1-6.
- Ahn, N., S. Kim, W. Choi, K. H. Im & Y. H. Lee, (2004) Extracellular matrix protein gene, EMP1, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Cells* **17**: 166-173.
- Alcazar-Fuoli, L., C. Clavaud, C. Lamarre, V. Aimanianda, V. Seidl-Seiboth, E. Mellado & J. P. Latge, (2010) Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol.*
- Allen, E. A., H. Hoch, J. Stavely & J. Steadman, (1991) Uniformity among races of *Uromyces appendiculatus* in response to topographic signaling for appressorium formation. *Phytopathology* **81**: 883-887.
- Almeida, J., A. Batista Filho & A. Santos, (2003) Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hem.; Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. *Arq. do Inst. Biol* **70**: 101-103.
- Alves, S., (1992) Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras* **27**: 77-86.
- Alves, S., (1998) Controle microbiano de insetos.
- Anderson, J. & J. Smith, (1971) The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation). *Microbiology* **69**: 185-197.
- Arakane, Y. & S. Muthukrishnan, (2010) Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell Mol Life Sci* **67**: 201-216.
- Arruda, W., I. Lübeck, A. Schrank & M. Vainstein, (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* **37**: 231-244.
- Bae, C. Y., S. Kim, W. B. Choi & Y. H. Lee, (2007) Involvement of extracellular matrix and integrin-like proteins on conidial adhesion and appressorium differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *J Microbiol Biotechnol* **17**: 1198-1203.

- Baek, J. M., C. R. Howell & C. M. Kenerley, (1999) The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* **35**: 41-50.
- Baker, L. G., C. A. Specht & J. K. Lodge, (2009) Chitinases Are Essential for Sexual Development but Not Vegetative Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell* **8**: 1692-1705.
- Baratto, C. M., V. Dutra, J. T. Boldo, L. B. Leiria, M. H. Vainstein & A. Schrank, (2006) Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase chi2 Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Curr Microbiol* **53**: 217-221.
- Baratto, C. M., M. Vanusa da Silva, L. Santi, L. Passaglia, I. S. Schrank, M. H. Vainstein & A. Schrank, (2003) Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology* **49**: 723-726.
- Bard, M., D. Bruner, C. Pierson, N. Lees, B. Biermann, L. Frye, C. Koegel & R. Barbuch, (1996) Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 186-190.
- Barreto, C. C., C. C. Staats, A. Schrank & M. H. Vainstein, (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Current microbiology* **48**: 102-107.
- Barson, G., N. Renn & A. F. Bywater, (1994) Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. In: *J Invertebr Pathol*. United States, pp. 107-113.
- Bateman, R., (1992) Controlled droplet application of myco-insecticides: an environmentally friendly way to control locusts. *Antenna (London)(United Kingdom)*.
- Benjamin, M., E. Zhioua & R. Ostfeld, (2002) Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology* **39**: 723-728.
- Bhambra, G. K., Z. Y. Wang, D. M. Soanes, G. E. Wakley & N. J. Talbot, (2006) Peroxisomal carnitine acetyl transferase is required for elaboration of penetration hyphae during plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Molecular microbiology* **61**: 46-60.
- Bidochka, M. J., J. De Koning & R. J. St Leger, (2001) Analysis of a genomic clone of hydrophobin (*ssgA*) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* **105**: 360-364.
- Bischoff, J. F., S. A. Rehner & R. A. Humber, (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**: 512.
- Bittencourt, S. E. T., L. Amaral de Castro, S. Estrazulas Farias, S. Nair Bao, A. Schrank & M. Henning Vainstein, (2004) Purification and ultrastructural

- localization of a copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. *Research in microbiology* **155**: 681-687.
- Bogo, M. R., C. A. Rota, H. Pinto, Jr., M. Ocampos, C. T. Correa, M. H. Vainstein & A. Schrank, (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol* **37**: 221-225.
- Boldo, J. T., K. B. Amaral, A. Junges, P. M. Pinto, C. C. Staats, M. H. Vainstein & A. Schrank, (2010) Evidence of alternative splicing of the *chi2* chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **462**: 1-7.
- Boldo, J. T., A. Junges, K. B. do Amaral, C. C. Staats, M. H. Vainstein & A. Schrank, (2009) Endochitinase *CHI2* of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr Genet* **55**: 551-560.
- Bosch, A. & O. Yantorno, (1999) Microcycle conidiation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* bals.(vuill.). *Process Biochemistry* **34**: 707-716.
- Boucias, D., J. Pendland & J. Latge, (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and environmental microbiology* **54**: 1795-1805.
- Bourett, T. M. & R. J. Howard, (1990) In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Canadian journal of botany* **68**: 329-342.
- Bowman, S. M. & S. J. Free, (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**: 799-808.
- Brachmann, A., J. Schirawski, P. Müller & R. Kahmann, (2003) An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal* **22**: 2199-2210.
- Broetto, L., W. Da Silva, A. Bailão, C. De Almeida Soares & M. Vainstein, Schrank, A, (2010) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. *FEMS Microbiol Lett.* **312**.
- Bustillo, A., M. Bernal, P. Benavides & B. Chaves, (1999) Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Florida Entomologist* **82**: 491-498.
- Butler, A. R., R. W. O'Donnell, V. J. Martin, G. W. Gooday & M. J. Stark, (1991) *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem* **199**: 483-488.
- Butt, T., C. Jackson & N. Magan, (2001) Introduction—Fungal biological control agents: progress, problems and potential. *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*, TM Butt, C. Jackson y N. Magan (eds.). CABI, Wallingford, Oxon: 1-8.

- Cantarel, B., P. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard & B. Henrissat, (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**.
- Caracuel-Rios, Z. & N. J. Talbot, (2007) Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Current opinion in microbiology* **10**: 339-345.
- Carsolio, C., N. Benhamou, S. Haran, C. Cortes, A. Gutierrez, I. Chet & A. Herrera-Estrella, (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and environmental microbiology* **65**: 929.
- Carsolio, C., A. Gutiérrez, B. Jiménez, M. Van Montagu & A. Herrera-Estrella, (1994) Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10903.
- Carvalho, L. R. M., (2009) Isolamento e caracterização do gene emp1 de *Metarhizium anisopliae* e ensaios de indução da diferenciação de apressório. In., pp.
- Chapman, R. F., (1998) *The insects : structure and function*. Cambridge Univ. Press, Cambridge [u.a.].
- Charnley, A., (1991) Microbial pathogens and insect pest control. *Letters in Applied Microbiology* **12**: 149-157.
- Chen, C. C., H. G. A. Kumar, S. Kumar, S. S. Tzean & K. W. Yeh, (2007) Molecular cloning, characterization, and expression of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*. *Current microbiology* **55**: 8-13.
- Chen, H. & G. R. Fink, (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development* **20**: 1150-1161.
- Chitarra, G. S., T. Abee, F. M. Rombouts, M. A. Posthumus & J. Dijksterhuis, (2004) Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and environmental microbiology* **70**: 2823-2829.
- Choi, J., K. S. Kim, H. S. Rho & Y. H. Lee, (2011) Differential roles of the phospholipase C genes in fungal development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* **48**: 445-455.
- Choi, J. H., Y. Kim & Y. H. Lee, (2009) Functional analysis of MCNA, a gene encoding a catalytic subunit of calcineurin, in the rice blast fungus *magnaporthe oryzae*. *J Microbiol Biotechnol* **19**: 11-16.
- Clarkson, J. & A. Charnley, (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* **4**: 197-203.
- Cliquet, S. & M. A. Jackson, (2005) Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **32**: 204-210.

- Colussi, P. A., C. A. Specht & C. H. Taron, (2005) Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2862-2869.
- Correa, A., R. Staples & H. Hoch, (1996) Inhibition of thigmostimulated cell differentiation with RGD-peptides in *Uromyces* germlings. *Protoplasma* **194**: 91-102.
- Coutinho, P., (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. *Recent advances in carbohydrate bioengineering*.
- Da Silva, M. V., S. Lucélia, C. C. Staats, A. M. da Costa, E. M. Colodel, D. Driemeier, V. M. Henning & A. Schrank, (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology* **156**: 382-392.
- Da Silva, W. O. B., L. Santi, A. Schrank & M. H. Vainstein, (2009) *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus infection. *Fungal Biology* **114**: 10-15.
- Dahiya, N., R. Tewari & G. S. Hoondal, (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied microbiology and biotechnology* **71**: 773-782.
- Danfa, A. & H. Van der Valk, (1999) Laboratory testing of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* on Sahelian non-target arthropods. *Biocontrol Science and Technology* **9**: 187-198.
- Davies, G. & B. Henrissat, (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**: 853-859.
- De Groot, P. W. J., A. F. Ram & F. M. Klis, (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal genetics and biology* **42**: 657-675.
- De Jong, J. C., B. J. McCormack, N. Smirnoff & N. J. Talbot, (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**: 244-244.
- De la Paz Gimenez-Pecchi, M., M. R. Bogo, L. Santi, C. K. Moraes, C. T. Corrêa, M. Henning Vainstein & A. Schrank, (2002) Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. *Current microbiology* **45**: 334-339.
- De las Mercedes Dana, M., M. C. Limón, R. Mejías, R. L. Mach, T. Benítez, J. A. Pintor-Toro & C. P. Kubicek, (2001) Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* **38**: 335-342.
- De Moraes, C. K., A. Schrank & M. H. Vainstein, (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current microbiology* **46**: 205-210.
- Dean, R., (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 211-234.
- Dean, R. A., N. J. Talbot, D. J. Ebbole, M. L. Farman, T. K. Mitchell, M. J. Orbach, M. Thon, R. Kulkarni, J.-R. Xu, H. Pan, N. D. Read, Y.-H. Lee, I. Carbone, D.

- Brown, Y. Y. Oh, N. Donofrio, J. S. Jeong, D. M. Soanes, S. Djonovic, E. Kolomiets, C. Rehmeyer, W. Li, M. Harding, S. Kim, M.-H. Lebrun, H. Bohnert, S. Coughlan, J. Butler, S. Calvo, L.-J. Ma, R. Nicol, S. Purcell, C. Nusbaum, J. E. Galagan & B. W. Birren, (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**: 980-986.
- DeZwaan, T. M., A. M. Carroll, B. Valent & J. A. Sweigard, (1999) *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *The Plant Cell Online* **11**: 2013-2030.
- Di Pietro, A., F. I. García Maceira, E. Meglecic & M. I. G. Roncero, (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology* **39**: 1140-1152.
- Dickman, M., Y. S. Ha, Z. Yang, B. Adams & C. Huang, (2003) A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. *Molecular plant-microbe interactions* **16**: 411-421.
- Dinardo-Miranda, L., A. Vasconcelos, J. Ferreira, C. Garcia Jr, Á. Coelho & M. Gil, (2004) Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål)(Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. *Neotrop. Entomol* **33**: 743-749.
- Dixon, K. P., J. R. Xu, N. Smirnov & N. J. Talbot, (1999) Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **11**: 2045-2058.
- Dohlman, H. G., (2002) G proteins and pheromone signaling. *Annual review of physiology* **64**: 129-152.
- Dong, C., J. Zhang, W. Chen, H. Huang & Y. Hu, (2007) Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. *Microbiological Research* **162**: 53-61.
- Driver, F., R. Milner & J. Trueman, (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* **104**: 134-150.
- Duan, Z., Y. Shang, Q. Gao, P. Zheng & C. Wang, (2009) A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environ Microbiol.* **11**: 2351-2360.
- Duo-Chuan, L., (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* **161**: 345-360.
- Duo-Chuan, L., S. Chen & L. Jing, (2005) Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* **159**: 223-229.
- Dutra, V., L. Nakazato, L. Broetto, I. Silveira Schrank, M. Henning Vainstein & A. Schrank, (2004) Application of representational difference analysis to identify

- sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Res Microbiol* **155**: 245-251.
- Ebbole, D. J., Y. Jin, M. Thon, H. Pan, E. Bhattarai, T. Thomas & R. Dean, (2004) Gene discovery and gene expression in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*: analysis of expressed sequence tags. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1337-1347.
- Elliot, S. L., S. Blanford & M. B. Thomas, (2002) Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proc Biol Sci* **269**: 1599-1607.
- Fan, Y., W. Fang, S. Guo, X. Pei, Y. Zhang, Y. Xiao, D. Li, K. Jin, M. J. Bidochka & Y. Pei, (2006) Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* overexpressing an engineered chitinase. *Applied and environmental microbiology: AEM*. 01974-01906v01971.
- Fang, W. & M. J. Bidochka, (2006) Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological research* **110**: 1165-1171.
- Fang, W., E. K. Fernandes, D. W. Roberts, M. J. Bidochka & R. J. St Leger, (2010) A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genet Biol* **47**: 602-607.
- Fang, W., B. Leng, Y. Xiao, K. Jin, J. Ma, Y. Fan, J. Feng, X. Yang, Y. Zhang & Y. Pei, (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and environmental microbiology* **71**: 363-370.
- Fang, W., M. Pava-ripoll, S. Wang & R. St Leger, (2009) Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol* **46**: 277-285.
- Fang, W., Y. Pei & M. J. Bidochka, (2007) A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology* **153**: 1017-1025.
- Fargues, J., N. Smits, C. Vidal, A. Vey, F. Vega, G. Mercadier & P. Quimby, (2002) Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia* **154**: 127-138.
- Fernandez, J. & R. A. Wilson, (2011) The sugar sensor, trehalose-6-phosphate synthase (*Tps1*), regulates primary and secondary metabolism during infection by the rice blast fungus: Will *Magnaporthe oryzae*'s "sweet tooth" become its "Achilles' heel"? *Mycology* **2**: 46-53.
- Ferreira, A. B. & N. L. Glass, (1996) PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genetics Newsletter*. 25-26.

- Filho, A., J. Almeida, A. Santos, L. Machado & S. Alves, (2003) Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). *Arq. Inst. Biol., São Paulo* **70**: 309-314.
- Foster, A. J., J. M. Jenkinson & N. J. Talbot, (2003) Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO Journal* **22**: 225-235.
- Frazzon, A. P. G., (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* **94**.
- Frazzon, A. P. G., I. d. S. Vaz Junior, A. Masuda, A. Schrank & M. H. Vainstein, (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* **94**: 117-125.
- Freimoser, F. M., G. Hu & R. J. S. Leger, (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology* **151**: 361.
- Freimoser, F. M., S. Screen, S. Bagga, G. Hu & R. J. St Leger, (2003) Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* **149**: 239.
- Fukamizo, T., (2000) Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci* **1**: 105-124.
- Gao, Q., K. Jin, S. H. Ying, Y. Zhang, G. Xiao, Y. Shang, Z. Duan, X. Hu, X. Q. Xie, G. Zhou, G. Peng, Z. Luo, W. Huang, B. Wang, W. Fang, S. Wang, Y. Zhong, L. Ma, R. J. St Leger, G. Zhao, Y. Pei, M. Feng, Y. Xia & C. Wang, (2011) Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics* **7**: 1-18.
- Gerber, L., K. Kodukula & S. Udenfriend, (1992) Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 12168-12173.
- Gillespie, J. P., R. Bateman & A. K. Charnley, (1998) Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *metarhizium* spp. for the desert locust, *schistocerca gregaria*. *J Invertebr Pathol* **71**: 128-137.
- Golebiowski, M., M. I. Bogus, M. Paszkiewicz & P. Stepnowski, (2011) Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. *Anal Bioanal Chem* **399**: 3177-3191.
- Gooday, G. W., (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS microbiology letters* **100**: 387-391.
- Gooday, G. W., (1999) Aggressive and defensive roles for chitinases. *EXS* **87**: 157-169.

- Gruber, S., G. Vaaje-Kolstad, F. Matarese, R. López-Mondéjar, C. Kubicek & V. Seidl-Seiboth, (2010) Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. *Glycobiology* **21**: 122-133.
- Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander & K. Davenport, (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular biology reviews* **62**: 1264-1300.
- Gökçe, A. & M. E. Kubilay, (2005) Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. *Turkish J. Agric. For* **29**: 331--339.
- Hajek, A. & R. St. Leger, (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* **39**: 293-322.
- Hamel, F., R. Boivin, C. Tremblay & G. Bellemare, (1997) Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *J Mol Evol* **44**: 614-624.
- Hanlin, R. T., (1994) Microcycle conidiation—a review. *Mycoscience* **35**: 113-123.
- Hatzipapas, P., K. Kalosak, A. Dara & C. Christias, (2002) Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycological Research* **106**: 1349-1359.
- He, M. & Y. Xia, (2009) Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings. *FEMS Microbiol Lett.* **291**: 127-135.
- Hegde, Y. & P. E. Kolattukudy, (1997) Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. *Physiological and molecular plant pathology* **51**: 75-84.
- Hogan, D. A., (2006) Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic cell* **5**: 613-619.
- Hogan, L. & B. a. L. Klein, SM, (1996) Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **9**: 469-488.
- Holsters, M., D. Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Montagu & J. Schell, (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG* **163**: 181-187.
- Hornbostel, V., R. Ostfeld & M. Benjamin, (2005) Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) engorging on *Peromyscus leucopus*. *Journal of Vector Ecology* **30**: 91.
- Howard, R. & B. Valent, (1996) Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Reviews in Microbiology* **50**: 491-512.
- Howard, R. J., M. A. Ferrari, D. H. Roach & N. P. Money, (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 11281-11284.

- Hu, G. & R. St Leger, (2002) Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and environmental microbiology* **68**: 6383.
- Hu, Q. B., S. X. Ren, J. H. Wu, J. M. Chang & P. D. Musa, (2006) Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon* **48**: 491-498.
- Jaques, A. K., T. Fukamizo, D. Hall, R. C. Barton, G. M. Escott, T. Parkinson, C. A. Hitchcock & D. J. Adams, (2003) Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiology* **149**: 2931-2939.
- Junges, Â., (2010) *Metarhizium anisopliae* : expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases. In.: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp.
- Juárez, M. P., R. Crespo, G. C. Fernández, R. Lecuona & L. F. R. Cafferata, (2000) Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *Journal of invertebrate pathology* **76**: 198-207.
- Kaaya, G. P. & D. M. Munyinyi, (1995) Biocontrol Potential of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse Flies (*Glossina* spp.) at Developmental Sites. *Journal of Invertebrate Pathology* **66**: 237-241.
- Kanzok, S. M. & M. Jacobs-Lorena, (2006) Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *TRENDS in Parasitology* **22**: 49-51.
- Karlsson, M. & J. Stenlid, (2008) Comparative evolutionary histories of the fungal chitinase gene family reveal non-random size expansions and contractions due to adaptive natural selection. *Evol Bioinform Online* **4**: 47-60.
- Kasprzewska, A., (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**: 809-824.
- Kern, M. F., S. F. Maraschin, D. Vom Endt, A. Schrank, M. H. Vainstein & G. Pasquali, (2009) Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. *Applied biochemistry and biotechnology* **160**: 1933-1946.
- Kershaw, M., E. Moorhouse, R. Bateman, S. Reynolds & A. Charnley, (1999) The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* **74**: 213-223.
- Khajuria, C., L. L. Buschman, M. S. Chen, S. Muthukrishnan & K. Y. Zhu, (2010) A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 621-629.
- Kim, D. J., J. M. Baek, P. Uribe, C. M. Kenerley & D. R. Cook, (2002) Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Curr Genet* **40**: 374-384.

- Kim, Y. K., D. Li & P. E. Kolattukudy, (1998) Induction of Ca²⁺-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *Journal of bacteriology* **180**: 5144-5150.
- Kirkland, B. H., G. S. Westwood & N. O. Keyhani, (2004) Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of medical entomology* **41**: 705-711.
- Klemsdal, S. S., J. L. Clarke, I. A. Hoell, V. G. H. Eijsink & M. B. Brurberg, (2006) Molecular cloning, characterization, and expression studies of a novel chitinase gene (ech30) from the mycoparasite *Trichoderma atroviride* strain P1. *FEMS microbiology letters* **256**: 282-289.
- Koga, D., M. Mitsutomi, M. Kono & M. Matsumiya, (1999) Biochemistry of chitinases. *Chitin and chitinases*: 111–123.
- Kojima, K., T. Kikuchi, Y. Takano, E. Oshiro & T. Okuno, (2002) The mitogen-activated protein kinase gene MAF1 is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular plant-microbe interactions* **15**: 1268-1276.
- Krieger de Moraes, C., A. Schrank & M. H. Vainstein, (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current microbiology* **46**: 205-210.
- Kuranda, M. J. & P. W. Robbins, (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 19758-19767.
- Lacey, C. M., L. A. Lacey & D. R. Roberts, (1988) Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. In: *J Invertebr Pathol. United States*, pp. 108-118.
- Lapaire, C. L. & L. D. Dunkle, (2003) Microcycle conidiation in *Cercospora zeae-maydis*. *Phytopathology* **93**: 193-199.
- Latgé, J. P., (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66**: 279-290.
- Leemon, D. M. & N. N. Jonsson, (2008) Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of invertebrate pathology* **97**: 40-49.
- Leger, R., A. Charnley & R. Cooper, (1987) Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of biochemistry and biophysics* **253**: 221-232.
- Lev, S., A. Sharon, R. Hadar, H. Ma & B. A. Horwitz, (1999) A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: Diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13542-13547.

- Li, J., S. Ying, L. Shan & M. Feng, (2010a) A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **85**: 975-984.
- Li, Y., X. Yan, H. Wang, S. Liang, W. B. Ma, M. Y. Fang, N. J. Talbot & Z. Y. Wang, (2010b) MoRic8 Is a novel component of G-protein signaling during plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 317-331.
- Li, Z., C. Wang & Y. Xia, (2008) Isolation of two Locust protein targets of a protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *J Invertebr Pathol* **99**: 151-155.
- Liang, Z.-Q., A.-Y. Liu & J.-L. Liu, (1991) A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta Mycologica Sinica* **10**: 257-262.
- Limon, M. C., J. M. Lora, I. Garcia, J. de la Cruz, A. Llobell, T. Benitez & J. A. Pintor-Toro, (1995) Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **28**: 478-483.
- Liu, H., A. Suresh, F. S. Willard, D. P. Siderovski, S. Lu & N. I. Naqvi, (2007) Rgs1 regulates multiple G subunits in *Magnaporthe* pathogenesis, asexual growth and thigmotropism. *The EMBO Journal* **26**: 690-700.
- Liu, J., Y. Cao & Y. Xia, (2010) Mmc, a gene involved in microcycle conidiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of invertebrate pathology* **105**: 132-138.
- Liu, W., X. Zhou, G. Li, L. Li, L. Kong, C. Wang, H. Zhang & J. R. Xu, (2011) Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. *PLoS Pathogens* **7**: e1001261.
- Liu, Z., Q. Yang, S. Hu, J. Zhang & J. Ma, (2008) Cloning and characterization of a novel chitinase gene (chi46) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. *Applied microbiology and biotechnology* **80**: 241-252.
- Lu, C. F., R. C. Montijn, J. L. Brown, F. Klis, J. Kurjan, H. Bussey & P. N. Lipke, (1995) Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1, 6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *The Journal of cell biology* **128**: 333-340.
- Lu, D., M. Pava-Ripoll, Z. Li & C. Wang, (2008) Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease. *Applied microbiology and biotechnology* **81**: 515-522.
- Luz, C., M. Tai, A. Santos & H. Silva, (2008) Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**: 214-215.
- Luz, C., M. S. Tigano, I. G. Silva, C. M. Cordeiro & S. M. Aljanabi, (1998) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**: 839-846.

- Lübeck, I., W. Arruda, B. Souza, F. Stanisçuaski, C. Carlini, A. Schrank & M. Vainstein, (2008) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology* **1**: 78-88.
- Machado, L. & E. Filho, (2006) PRÁTICA CULTURAL ASSOCIADA AO CONTROLE BIOLÓGICO COM O FUNGO METARHIZIUM ANISOPLIAE NO COMBATE À BROCA-DOS-CITROS DIPLOSCHEMA ROTUNDICOLLE. *Arq. Inst. Biol., São Paulo* **73**: 439-445.
- Manalil, N. S., V. Junior Téó, K. Braithwaite, S. Brumley, P. Samson & K. Helena Nevalainen, (2010) Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles. *Fungal Biology* **114**: 637-645.
- Markowitz, V. M., I. M. Chen, K. Palaniappan, K. Chu, E. Szeto, Y. Grechkin, A. Ratner, I. Anderson, A. Lykidis, K. Mavromatis, N. N. Ivanova & N. C. Kyrpides, (2010) The integrated microbial genomes system: an expanding comparative analysis resource. *Nucleic Acids Res* **38**: D382-390.
- Markowitz, V. M., E. Szeto, K. Palaniappan, Y. Grechkin, K. Chu, I. M. Chen, I. Dubchak, I. Anderson, A. Lykidis, K. Mavromatis, N. N. Ivanova & N. C. Kyrpides, (2008) The integrated microbial genomes (IMG) system in 2007: data content and analysis tool extensions. *Nucleic Acids Res* **36**: D528-533.
- Martins, J., M. Botton, J. Carbonari & E. Quintela, (2004) Efficiency of *Metarhizium anisopliae* on rice stem bug *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) control in flooded rice field. *Ciência Rural* **34**: 1681-1688.
- Mayor, S. & H. Riezman, (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 110-120.
- McCreath, K. J., C. A. Specht, Y. Liu & P. W. Robbins, (1996) Molecular cloning of a third chitinase gene (CHT1) from *Candida albicans*. *Yeast* **12**: 501-504.
- McCreath, K. J., C. A. Specht & P. W. Robbins, (1995) Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2544-2548.
- Merzendorfer, H. & L. Zimoch, (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* **206**: 4393-4412.
- Messias, C., R. Daoust & D. Roberts, (1986) Virulence of a natural isolate, auxotrophic mutants, and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. *Journal of invertebrate pathology (USA)*.
- Michielse, C., M. Arentshorst, A. Ram & C. Van Den Hondel, (2005) Agrobacterium-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 9-19.
- Milner, R., (1992) Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia.

- Milner, R., (2000) Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News and Information* **21**: 47N-50N.
- Mishra, S., P. Kumar, A. Malik & S. Satya, (2010) Adulticidal and larvicidal activity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), in laboratory and simulated field bioassays. *Parasitol Res.*
- Mitchell, T. K. & R. A. Dean, (1995) The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **7**: 1869-1878.
- Mnyone, L. L., M. J. Kirby, M. W. Mpingwa, D. W. Lwetoijera, B. G. Knols, W. Takken, C. J. Koenraadt & T. L. Russell, (2010) Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol Res.*
- Mohanty, S. S., K. Raghavendra, P. K. Mittal & A. P. Dash, (2008) Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 1199-1202.
- Money, N., (2007) Biomechanics of invasive hyphal growth. *Biology of the Fungal Cell* **8**: 237-249.
- Money, N. P. & R. J. Howard, (1996) Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genetics and Biology* **20**: 217-227.
- Morissette, D., P. Seguin & S. Jabaji-Hare, (2006) Expression regulation of the endochitinase-encoding gene *sechi44* from the mycoparasite *Stachybotrys elegans*. *Canadian journal of microbiology* **52**: 1103-1109.
- Nakazato, L., (2005) Desenvolvimento de um sistema de expressão em *Metarhizium anisopliae* baseado no promotor homólogo do gene *tef-1*. In: Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul.: Universidade Federal do Rio Grande do Sul., pp.
- Nakazato, L., V. Dutra, L. Broetto, C. C. Staats, M. H. Vainstein & A. Schrank, (2006) Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1*alpha homologous promoter. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 521-528.
- Nishimura, M., G. Park & J. R. Xu, (2003) The G beta subunit MGB1 is involved in regulating multiple steps of infection related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Molecular microbiology* **50**: 231-243.
- Nowierski, R. M., Z. Zeng, S. Jaronski, F. Delgado & W. Swearingen, (1996) Analysis and Modeling of Time-Dose-Mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Paecilomyces* Isolates from Madagascar. In: *J Invertebr Pathol.* pp. 236-252.
- Ober, C. & G. L. Chupp, (2009) The chitinase and chitinase-like proteins: a review of genetic and functional studies in asthma and immune-mediated diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**: 401-408.

- Ortiz Urquiza, A., I. Garrido Jurado, A. Borrego & E. Quesada Moraga, (2010) Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). *Pest management science* **66**: 725-735.
- Pal, S., R. J. St Leger & L. P. Wu, (2007) Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. **282**: 8969-8977.
- Park, G., C. Xue, X. Zhao, Y. Kim, M. Orbach & J. R. Xu, (2006) Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **18**: 2822-2835.
- Patil, R. S., V. Ghormade & M. V. Deshpande, (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* **26**: 473-483.
- Pava-Ripoll, M., F. J. Posada, B. Momend, C. Wang & R. St. Leger, (2008) Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *Journal of Invertebrate Pathology* **99**: 220-226.
- Pedras, M. S., L. I. Zaharia & D. E. Ward, (2002) The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*. **59**: 579-596.
- Pedrini, N., R. Crespo & M. P. Juarez, (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**: 124-137.
- Peng, G., L. Xie, J. Hu & Y. Xia, (2009) Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenous cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization. *Current genetics* **55**: 263-271.
- Pinto, A. S., C. C. Barreto, M. H. Vainstein, A. Schrank & C. J. Ulhoa, (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian journal of microbiology* **43**: 322-327.
- Pittet, M. & A. Conzelmann, (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**: 405-420.
- Rampelotti, F., A. Ferreira, H. Prando, A. Grützmacher, J. Martins, F. Tcacenco & M. Mattos, (2007) Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo* **74**: 141-148.
- Rangel, D. E. N., A. J. Anderson & D. W. Roberts, (2006) Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of invertebrate pathology* **93**: 127-134.
- Rishi, A., N. D. Nelson & A. Goyal, (2004) Genome walking of large fragments: an improved method. *Journal of biotechnology* **111**: 9-15.

- Roberts, D. W. & R. J. St. Leger, (2004) *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Advances in Applied Microbiology* **54**: 1-70.
- Roy, H. E., D. C. Steinkraus, J. Eilenberg, A. E. Hajek & J. K. Pell, (2006) Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.* **51**: 331-357.
- Ruiz-Roldán, M. C., F. J. Maier & W. Schäfer, (2001) PTK1, a mitogen-activated-protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 116-125.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning*. CSHL Press.
- Santi, L., W. O. Beys da Silva, M. Berger, J. A. Guimarães, A. Schrank & M. H. Vainstein, (2010) Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon* **55**: 874-880.
- Saunders, D. G. O., Y. F. Dagdas & N. J. Talbot, (2010) Spatial uncoupling of mitosis and cytokinesis during appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell Online* **22**: 2417-2428.
- Schoffemeer, E., F. Klis, J. Sietsma & B. Cornelissen, (1999) The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 275-282.
- Schoffemeer, E., J. Vossen, A. Van Doorn, B. Cornelissen & M. Haring, (2001) FEM1, a *Fusarium oxysporum* glycoprotein that is covalently linked to the cell wall matrix and is conserved in filamentous fungi. *Molecular genetics and genomics: MGG* **265**: 143-152.
- Scholte, E.-J., K. Ng'habi, J. Kihonda, W. Takken¹, K. Paaijmans, S. Abdulla & G. F. K. a. B. G. J. Knols, (2005) An Entomopathogenic Fungus for Control of Adult African Malaria Mosquitoes | Science/AAAS. *Science* **308**: 1641-1642.
- Scholte, E. J., B. N. Njiru, R. C. Smallegange, W. Takken & B. G. Knols, (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In: Malar J. England, pp. 29.
- Scholte, E. J., W. Takken & B. G. J. Knols, (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta tropica* **102**: 151-158.
- Schrank, A. & M. H. Vainstein, (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*.
- Screen, S. E., G. Hu & R. J. St Leger, (2001) Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of invertebrate pathology* **78**: 260-266.

- Seidl, V., (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* **22**: 36-42.
- Seidl, V., B. Huemer, B. Seiboth & C. P. Kubicek, (2005) A complete survey of Trichoderma chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* **272**: 5923-5939.
- Seyoum, E., R. Bateman & A. Charnley, (2002) The effect of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Applied Entomology* **126**: 119-124.
- Shah, P. A. & J. K. Pell, (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 413-423.
- Shin, K. S., N. J. Kwon, Y. H. Kim, H. S. Park, G. S. Kwon & J. H. Yu, (2009) Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **8**: 738.
- Shuhui, L., Y. K. Mok & W. S. Wong, (2009) Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **149**: 369-377.
- Silva, J. & C. Messias, (1986) Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *Journal of invertebrate pathology* **48**: 368-374.
- Silva, W. O. B., L. Santi, M. Berger, A. F. M. Pinto, J. A. Guimarães, A. Schrank & M. H. Vainstein, (2009) Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* **44**.
- Skamnioti, P. & S. J. Gurr, (2007) *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *The Plant Cell Online* **19**: 2674-2689.
- Skrobek, A., S. A. Farooq & T. M. Butt, (2008) Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioControl* **53**: 361-373.
- Small, C. L. N. & M. J. Bidochka, (2005) Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological research* **109**: 307-313.
- Sosa-Gómez, D. & F. Moscardi, (1998) Laboratory and Field Studies on the Infection of Stink Bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil* 1. *Journal of invertebrate pathology* **71**: 115-120.
- Sree, K. S. & V. Padmaja, (2008) Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Journal of Applied Entomology* **132**: 68-78.
- Sree, K. S., V. Padmaja & Y. L. Murthy, (2008) Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Manag Sci.* **64**: 119-125.

- St Leger, R., (2008) Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of invertebrate pathology* **98**: 271-276.
- St Leger, R., T. Butt, R. Staples & D. Roberts, (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* **136**: 1779.
- St Leger, R., R. Cooper & A. Charnley, (1991a) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**: 415-426.
- St Leger, R., L. Joshi, M. Bidochka, N. Rizzo & D. Roberts, (1996a) Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and environmental microbiology* **62**: 907.
- St Leger, R., L. Joshi, M. Bidochka & D. Roberts, (1996b) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 6349.
- St Leger, R., L. Joshi, M. J. Bidochka, N. W. Rizzo & D. W. Roberts, (1996c) Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and environmental microbiology* **62**: 1257-1264.
- St Leger, R., J. L. B. M. J & D. W. and Roberts, (1996d) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *PNAS* **93**: 6349 -6354.
- ST Leger, R. J., (2007) *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions. *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*: 179-204.
- St Leger, R. J., T. M. Butt, M. S. Goettel, R. C. Staples & D. W. Roberts, (1989) Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental mycology* **13**: 274-288.
- ST Leger, R. J., R. M. Cooper & A. K. Charnley, (1986) Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes. *Journal of General Microbiology* **132**: 1509-1517.
- St Leger, R. J., M. Goettel, D. W. Roberts & R. C. Staples, (1991b) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**: 168-179.
- St Leger, R. J., L. Joshi, M. J. Bidochka & D. W. Roberts, (1995) Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. *Mycological Research* **99**: 1034-1040.
- St Leger, R. J., R. C. Staples & D. W. Roberts, (1992) Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **120**: 119-124.

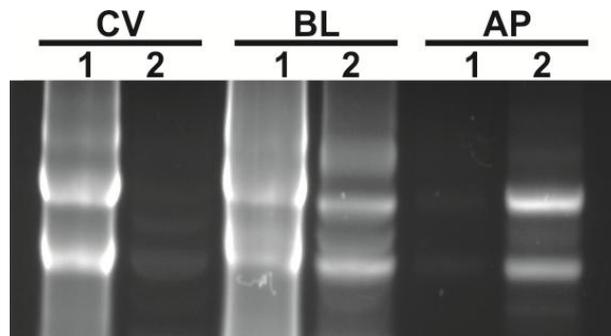
- Staats, C. C., (2007) Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp.
- Staats, C. C., A. Junges, M. Fitarelli, M. C. Furlaneto, M. H. Vainstein & A. Schrank, (2007) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 945-950.
- Sung, G. H., N. L. Hywel-Jones, J. M. Sung, J. J. Luangsa-ard, B. Shrestha & J. W. Spatafora, (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* **57**: 5.
- Suzuki, M., W. Fujimoto, M. Goto, M. Morimatsu, B. Syuto & T. Iwanaga, (2002) Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *J Histochem Cytochem* **50**: 1081-1089.
- Takano, Y., K. Komeda, K. Kojima & T. Okuno, (2001) Proper regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase is required for growth, conidiation, and appressorium function in the anthracnose fungus *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 1149-1157.
- Talaei-hassanloui, R., A. Kharazi-pakdel, M. S. Goettel, S. Little & J. Mozaffari, (2007) Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *Journal of invertebrate pathology* **94**: 102-107.
- Talbot, N. J., (1995) Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends in microbiology* **3**: 9-16.
- Thines, E., F. Eilbert, O. Sterner & H. Anke, (1997) Signal transduction leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea*: Effects of second messengers diacylglycerols, ceramides and sphingomyelin. *FEMS microbiology letters* **156**: 91-94.
- Thines, E., R. W. S. Weber & N. J. Talbot, (2000) MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell Online* **12**: 1703.
- Thomas, M. B. & A. F. Read, (2007) Can fungal biopesticides control malaria? *Nat Rev Micro* **5**: 377-383.
- Thompson, C. J., N. R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J. E. Davies, M. Lauwereys & J. Botterman, (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* **6**: 2519-2523.
- Tucker, S. L. & N. J. Talbot, (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 385-417.
- Tulloch, M., (1976) The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society* **66**: 407-411.

- Uhm, K. H., I. P. Ahn, S. Kim & Y. H. Lee, (2003) Calcium/calmodulin-dependent signaling for prepenetration development in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* **93**: 82-87.
- Van Aalten, D., D. Komander, B. Synstad, S. Gåseidnes, M. Peter & V. Eijsink, (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 8979.
- Veneault-Fourrey, C., M. Barooah, M. Egan, G. Wakley & N. J. Talbot, (2006) Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. *Science* **312**: 580-583.
- Vicencio, A. G., S. Narain, Z. Du, W. Y. Zeng, J. Ritch, A. Casadevall & D. L. Goldman, (2008) Pulmonary cryptococcosis induces chitinase in the rat. *Respir Res* **9**: 40.
- Vidal, C., J. Fargues, L. A. Lacey & M. A. Jackson, (1998) Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia* **143**: 33-46.
- Viterbo, A., M. Montero, O. Ramot, D. Friesem, E. Monte, A. Llobell & I. Chet, (2002) Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr Genet* **42**: 114-122.
- Wang, C., Z. Duan & R. J. St Leger, (2008) MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell* **7**: 302-309.
- Wang, C., G. Hu & R. St Leger, (2005a) Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 704-718.
- Wang, C. & J. Powell, (2004) Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biological control* **30**: 523-529.
- Wang, C. & R. St Leger, (2006) A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. In.: National Acad Sciences, pp.
- Wang, C. & R. St Leger, (2007a) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* **6**: 808.
- Wang, C. & R. St Leger, (2007b) The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 21110.
- Wang, C. & R. J. St Leger, (2007c) A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nat Biotech* **25**: 1455-1456.
- Wang, Z., J. Jenkinson, L. Holcombe, D. Soanes, C. Veneault-Fourrey, G. Bhambra & N. Talbot, (2005b) The molecular biology of appressorium turgor generation by

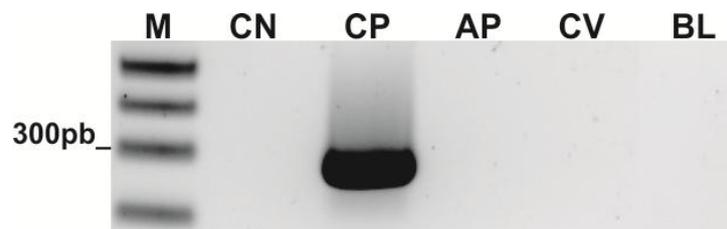
- the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biochemical Society Transactions* **33**: 384-388.
- Wang, Z. Y., D. M. Soanes, M. J. Kershaw & N. J. Talbot, (2007) Functional analysis of lipid metabolism in *Magnaporthe grisea* reveals a requirement for peroxisomal fatty acid -oxidation during appressorium-mediated plant infection. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 475-491.
- Wattanalai, R., D. Boucias, A. Tartar & C. Wiwat, (2004) Chitinase gene of the dimorphic mycopathogen, *Nomuraea rileyi*. *Journal of invertebrate pathology* **85**: 54-57.
- Weld, R. J., K. M. Plummer, M. A. Carpenter & H. J. Ridgway, (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell research* **16**: 31-44.
- Wessels, J., (1996) Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in plant science* **1**: 9-15.
- Wilson, R. A., J. M. Jenkinson, R. P. Gibson, J. A. Littlechild, Z. Y. Wang & N. J. Talbot, (2007) Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. *The EMBO Journal* **26**: 3673-3685.
- Wilson, R. A. & N. J. Talbot, (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat Rev Microbiol* **7**: 185-195.
- Wu, A. C., J. Lasky-Su, C. A. Rogers, B. J. Klanderman & A. Litonjua, (2010) Polymorphisms of chitinases are not associated with asthma. *J Allergy Clin Immunol* **125**: 754-757, 757 e751-757 e752.
- Xavier-Santos, S., B. Magalhães & E. Lima, (1999) Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). *Revista de microbiologia* **30**: 47-51.
- Xia, Y., J. Clarkson & A. Charnley, (2002) Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of invertebrate pathology* **80**: 139-147.
- Xiao, J. Z., T. Watanabe, T. Kamakura, A. Ohshima & I. Yamaguchi, (1994) Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*. Physicochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation. *Physiological and molecular plant pathology* **44**: 227-236.
- Xu, J. R., (2000) MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 137-152.
- Xu, J. R., M. Urban, J. A. Sweigard & J. E. Hamer, (1997) The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. *Molecular plant-microbe interactions* **10**: 187-194.
- Yamazaki, H., A. Tanaka, J.-i. Kaneko, A. Ohta & H. Horiuchi, (2008) *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 963-972.

- Yamazaki, H., D. Yamazaki, N. Takaya, M. Takagi, A. Ohta & H. Horiuchi, (2007) A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **51**: 89-98.
- Yi Liu, Z., Z. Q. Liang, A. J. Whalley, Y. J. Yao & A. Y. Liu, (2001) *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J Invertebr Pathol* **78**: 178-182.
- Ypsilos, I. & N. Magan, (2004) Impact of water-stress and washing treatments on production, synthesis and retention of endogenous sugar alcohols and germinability of *Metarhizium anisopliae* blastospores. *Mycological research* **108**: 1337-1345.
- Zhang, C. & Y. Xia, (2009) Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. *Current genetics* **55**: 399-407.
- Zhang, H., K. Liu, X. Zhang, W. Tang, J. Wang, M. Guo, Q. Zhao, X. Zheng, P. Wang & Z. Zhang, (2011) Two phosphodiesterase genes, *PDEL* and *PDEH*, regulate development and pathogenicity by modulating intracellular cyclic AMP levels in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS One* **6**: e17241.
- Zhang, W. M., T. H. Li, Y. Q. Chen & L. H. Qu, (2004) *Cordyceps campsosterna*, a new pathogen of *Campsosternus auratus*. *Fungal Diversity* **17**: 239-242.
- Zhang, Y., J. Zhang, X. Jiang, G. Wang, Z. Luo, Y. Fan, Z. Wu & Y. Pei, (2010) Requirement of a Mitogen-Activated Protein Kinase for Appressorium Formation and Penetration of Insect Cuticle by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and environmental microbiology* **76**: 2262-2270.
- Zhao, H., A. K. Charnley, Z. Wang, Y. Yin, Z. Li, Y. Li, Y. Cao, G. Peng & Y. Xia, (2006) Identification of an extracellular acid trehalase and its gene involved in fungal pathogenesis of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of biochemistry* **140**: 319-327.
- Zhao, X., Y. Kim, G. Park & J. R. Xu, (2005) A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. In: *Plant Cell*. United States, pp. 1317-1329.
- Zhioua, E., M. Browning, P. W. Johnson, H. S. Ginsberg & R. A. LeBrun, (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *The Journal of parasitology*: 815-818.
- Zhou, X. L., M. A. Stumpf, H. C. Hoch & C. Kung, (1991) A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. *Science* **253**: 1415-1417.

ANEXOS



Anexo 1 – Integridade do RNA total oriundo de diferentes tipos celulares de *M. anisopliae*. (CV) RNA total da condição de crescimento vegetativo; (BL) RNA total da condição de diferenciação em blastosporos; (AP) RNA total da condição de diferenciação em apressório; (1 e 2) replicas biológicas de cada condição de cultivo.



Anexo 2 – Reação de controle negativo de RNAs total oriundos de diferentes tipos celulares de *M. anisopliae*. (M) Marcador DNA 1kb plus ladder; (CN) controle negativo; CP: controle positivo (amplicon com 300pb referente ao gene β -tubulina a partir de DNA genômico de *M. anisopliae* E6); (AP) RNA total extraído a partir de células fúngicas diferenciadas em apressório; (CV) RNA total extraído a partir de células fúngicas diferenciadas em hifas (crescimento vegetativo); (BL) RNA total extraído a partir de células fúngicas diferenciadas em blastosporos. (Os RNAs total foram utilizados como molde para a reação de PCR negativo para o gene da beta-tubulina).

Anexo 3 – Currículo Lattes

Bárbara Kunzler Souza

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Completo Bárbara Kunzler Souza
Filiação Antônio Carlos Cardozo Souza e Zuleica Maria Kunzler Souza
Data de Nascimento 17/09/1984 - Canoas/RS - Brasil
Carteira de Identidade 1082095934 SSP - RS - 17/09/1997
CPF 00768559022

Endereço Residencial Rua Anita Garibaldi, 345, apto.202
Centro - Canoas
92010-100, RS - Brasil
Telefone: 51 34641786

Endereço Profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Avenida Bento Gonçalves 9500 Prédio 43421/lab.217
Agronomia - Porto Alegre
91509-970, RS - Brasil
Telefone: 51 33086079

Endereço Eletrônico

e-mail para contato : barbaraks@cbiot.ufrgs.br
e-mail alternativo : barbarakunzler@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2009 - atual Mestrado em Biologia Celular e Molecular .
Centro de Biotecnologia – Cbiot – UFRGS – Brasil
Título: *Metarhizium anisopliae*: Estudo funcional do gene *emp1* e Análise transcricional de quitinases em diferentes estágios de diferenciação celular
Orientador: Augusto Schrank
Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2003 - 2009 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil
Título: Identificação de genes diferencialmente expressos em *Metarhizium anisopliae*
Orientador: Augusto Schrank
Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação Complementar

2007 - 2007 Extensão Universitária em Controle Microbiano de Vetores e Pragas: Bactérias.
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil

2007 - 2007	Extensão Universitária em Introdução a Biologia Molecular Computacional. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2003 - 2007	Curso Técnico de Química. Escola Técnica da UFRGS, ETC, Porto Alegre, Brasil
2006 - 2006	Extensão Universitária em Fundamentos de Virologia Patogênica. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil
2006 - 2006	Extensão Universitária em Genética na UFRGS: Pesquisa e Ensino ao Alcance de Estudantes e Professores. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2005 - 2005	Extensão Universitária em Neurociências: Efeito das Drogas sobre o Cérebro -. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil
2005 - 2005	Extensão Universitária em Biologia Molecular Básica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Experiência Profissional

1. Centro de Biotecnologia – CBIOT – UFRGS

Vínculo Institucional

2009 - Current	Vínculo: aluno, Enquadramento funcional: Estudante de mestrado , Regime: Dedicção exclusiva
2007 - 2009	Vínculo: aluno, Enquadramento funcional: Estagiário, Regime: Dedicção exclusiva
2007 - 2007	Vínculo: aluno, Enquadramento funcional: Estagiário voluntário

Áreas de Atuação

1. Biologia Molecular
2. Genética Molecular de Microrganismos
3. Biologia Molecular de Fungos filamentosos

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol	Compreende o Básico, Lê Pouco

Produção em C, T & A

Produção Bibliográfica Artigos Completos Publicados em Periódicos

Lübeck, Irina, Arruda, Walquíria, Souza, Bárbara K., Stanisçuaski, Fernanda, Carlini, Célia R., Schrank, Augusto, Vainstein, Marilene H.
 Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus* **Fungal Ecology** v.1, p. 78-88, 2008.

Trabalhos publicados em Anais de Eventos (Resumos)

1. SOUZA, B.K., JUNGES, A., BROETTO, L., STAATS, C.C., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

Análise Transcricional de Quitinases nos Estágios de Germinação, Formação de apressório e de Blastosporos e Caracterização do Gene *emp1* no Fungo *Metarhizium anisopliae* In: X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010.

Livro de Resumos do X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS., 2010, v.1, p.12

2. SOUZA, B.K., CARVALHO, L.R.M., STAATS, C.C., BOLDO, J.T., JUNGES, A., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

Estudo da função do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae* In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009.

Livro de Resumos do IX Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS., 2009, v.1, p.16

3. SOUZA, B.K., BOLDO, J.T., STAATS, C.C., BROETTO, L., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A.

Análise Transcricional de Quitinases durante a Formação de Corpos Hifais em *Metarhizium anisopliae* In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009.

Livro de Resumos do IX Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS., 2009, v.1, p.17

4. BROETTO, L.; LANDELL, M.; BERINGER, J.; KUNZLER, B.; JUNGES, A.; BOLDO, J. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.

Caracterização da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo *Metarhizium anisopliae* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE

Livro de Resumos do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, v.1, Resumoid:434-1

5. SOUZA, B. K., STAATS, C. C., Carvalho, R. M. L., SCHRANK, A.

Identificação de genes diferencialmente expressos em blastosporos de *Metarhizium anisopliae* In: XX Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2008, Porto Alegre.

6. SOUZA, B. K., CARVALHO, L. R. M., STAATS, C. C., SCHRANK, A.

Isolamento e caracterização do gene ortólogo *emp1* de *Metarhizium anisopliae* In: Mostra de Iniciação Científica - UNISINOS, 2008, São Leopoldo.

7. SOUZA, B. K., CARVALHO, L. R. M., STAATS, C. C., SCHRANK, A.

Construção de um cassete de inativação para o gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae* In: IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2008, Porto Alegre.

8. SOUZA, B. K., LUBECK, I., SCHRANK, A., Vainstein, M. H.

Análise da secreção de *Metarhizium anisopliae* sob diferentes fontes de carbono In: XIX Salão de Iniciação Científica da - UFRGS, 2007, Porto Alegre.