

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *emp1* de *Metarhizium*
anisopliae E ENSAIOS DE INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE
APRESSÓRIO**

Dissertação de Mestrado

LIS RIBEIRO MAGALHÃES DE CARVALHO

Porto Alegre, 2009

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *emp1* de *Metarhizium
anisopliae* E ENSAIOS DE INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE
APRESSÓRIO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

LIS RIBEIRO MAGALHÃES DE CARVALHO

ORIENTADOR: PROF. DR. AUGUSTO SCHRANK

Porto Alegre, 2009

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

À minha família por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

“A felicidade só é verdadeira quando compartilhada”

(Christopher McCandless)

Agradeço ao orientador deste trabalho, professor Dr. Augusto Schrank pela confiança, paciência e ensinamentos.

Aos professores Dr. Marilene Henning Vainstein e Gustavo Goldman, membros da comissão de acompanhamento.

A professora Dr. Irene Silveira Schrank pelos valiosos conselhos e correções durante a elaboração da redação científica.

Aos demais professores do CBiot.

Aos amigos, companheiros de trabalho (e não só de trabalho) dos laboratórios 217, 220 e 222, obrigada por fazerem do CBiot a extensão da minha casa.

E à família que ganhei em Porto Alegre:

A Carolina Silveira pela amizade incondicional, pelo carinho, palpites, conselhos e abrigo.

A Ângela Junges pelo suporte técnico, mental, emocional, psicológico.

Juliana Crestani, minha irmãzinha, pela amizade, pelos abraços, conversas, e por me fazer acreditar sempre.

Melissa Landel pelos sorrisos, conselhos e momentos felizes que passamos juntas.

Irina Lübeck pelos momentos de distração e pelo companheirismo.

A Roberta por todas as palavras doces e carinho.

Lívia K. R. e Silva, por todo o cuidado, companheirismo, carinho e por ser sempre uma pessoa admirável e uma grande amiga.

Barbara Kunzler por ter me ensinado a ensinar, pelos momentos de amizade e paciência, por entender meus momentos de confusão mental e ainda assim permanecer ao meu lado

Karina Amaral, Juliana Beringer e Natália por terem alegrado meus dias e me ajudado sempre.

Juliano Tomazonni Boldo, meu irmãozinho, pelo suporte técnico e mental, pelos momentos de distração, pela paciência, pelos cuidados, por todas as piadas e sorrisos.

Leonardo Broetto, também pelo suporte técnico e mental, pela proteção, pelas muitas conversas e debates, e pelo carinho.

Charley C. Staats, por todos os cuidados e por ter sido meu amigo e meu orientador.

A rede PIGS no CBIOT-UFRGS pelos seqüenciamentos realizados.

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

Aos funcionários do CBIOT Sr. Paulo e especialmente ao Sr. Milton pelo auxílio constante, carinho e dedicação.

SUMÁRIO

	Listas de abreviaturas, símbolos e unidades	VIII
	Lista de figuras	X
	Lista de tabelas	XI
	Resumo	XIII
	Abstract	XIV
1.	Introdução	14
2	Revisão Bibliográfica	16
2.1	Características gerais do fungo filamentosso <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
2.1.1	O processo de infecção de <i>M. anisopliae</i>	19
2.2	Diferenciação de Apressório	25
2.2.1	Apressório em fungos fitopatogênicos	26
2.2.1.1	Fisiologia da formação de apressório	27
2.2.1.2	Diferenciação de apressório e ciclo celular	30
2.2.1.3	Vias de sinalização celular envolvidas na diferenciação de apressório	31
2.2.2	Apressório em fungos entomopatogênicos	38
2.3	Proteínas de matriz extracelular	41
3	Objetivos	44
3.1	Objetivos gerais	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	Material e métodos	45
4.1	Soluções e meios de cultivo	45
4.1.1	Meio de Cove (MC)	45
4.1.2	Meio de Cove completo (MCc)	45
4.1.3	Solução de sais	45
4.1.4	Solução de elementos traços	46
4.1.5	Meio Luria – Bertani (LB)	46

4.1.6	Meio indutor (IM)	46
4.2	Microrganismos e condições de cultivo	47
4.2.1	Linhagem de <i>Metarhizium anisopliae</i>	47
4.2.1.1	Suspensão de esporos	47
4.2.2	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>	47
4.2.3	Linhagem de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
4.3	Transformação de <i>Metarhizium anisopliae</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
4.4	Manipulação e isolamento de DNA	49
4.5	Clonagem e sequenciamento do gene <i>emp1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	50
4.6	Indução da diferenciação de apressório de <i>Metarhizium anisopliae</i>	51
4.7	Construção do vetor pPZP: <i>bar: emp1</i> para inativação do gene <i>emp1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	51
5	Resultados	53
5.1	Isolamento e caracterização da sequência do gene <i>emp1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	53
5.2	Padronização da diferenciação de apressório por <i>Metarhizium anisopliae</i>	61
5.3	Construção do vetor pPZP: <i>bar: emp1</i> para inativação do gene <i>emp1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	70
6	Discussão	72
7	Conclusões	78
8	Perspectivas	79
9	Referências	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

<i>bar</i>	Gene de Fosfinotricina acetiltransferase de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
BD	Borda direita
BE	Borda esquerda
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i> (etiquetas de seqüências expressas)
g	Grama; força gravitacional
h	Hora
IM	Meio de indução
KDa	Quilo daltons = 1000 daltons
LB	Meio de Luria-Bertani
m/v	Massa por volume
M	Molar
MC	Meio de Cove
MCC	Meio de Cove completo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitros
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
OD ₆₆₀	Densidade ótica no comprimento de onda de 660 nm
pb	Pares de bases
pI	Ponto isoelétrico
PCR	Reação em cadeia da DNA Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
%	Por cento
RNAi	RNA de interferência

rpm	Rotações por minuto
Tween	Polisorbinato
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características morfológicas de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	16
Figura 2	Diferenciação de apressório de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre a superfície do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	21
Figura 3	Ciclo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	24
Figura 4	Via de sinalização necessária para infecção e desenvolvimento de <i>Magnaporthe oryzae</i> .	37
Figura 5	Montagem do cassete de inativação <i>bar: emp1</i> para <i>Metarhizium anisopliae</i>	52
Figura 6	Produtos da amplificação das bibliotecas de DNA genômico de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	54
Figura 7	Identificação da sequência de <i>emp1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolada por <i>Genome Walking</i> .	55
Figura 8	Sequência de nucleotídeos e da proteína predita <i>Emp1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	57
Figura 9:	Alinhamento da proteína <i>Emp1</i> com sequências de proteínas ortólogas.	59
Figura 10:	Determinação do número de cópias do gene <i>emp1</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	61
Figura 11:	Cultivo de <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio contendo 0,0125 % de extrato de levedura.	63
Figura 12	Cultivo de <i>Metarhizium anisopliae</i> em diferentes concentrações de conídios em meio contendo 0,0060% de extrato de levedura.	64
Figura 13	Cultivo de <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio contendo 0,0040 % de extrato de levedura.	65
Figura 14	Indução da formação de apressório de <i>Metarhizium anisopliae</i> cultivado por 12 e 16 horas	67
Figura 15	Diferenciação de apressório de <i>Metarhizium. anisopliae</i>	69
Figura 16	Construção do plasmídeo pPZP: <i>bar: emp1</i> .	70
Figura 17	Análise de transformantes de <i>Metarhizium anisopliae</i> para a confirmação da presença do cassete <i>bar: emp1</i> .	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Possíveis hospedeiros do entomopatógeno <i>Metarhizium. anisopliae</i>	18
Tabela 2	Fungos entomopatogênicos capazes de realizar a diferenciação de apressório	38
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	50
Tabela 4	Valores de identidade e similaridade para o alinhamento da sequência predita de aminoácidos da proteína de matriz extracelular Emp1 com as proteínas ortólogas de espécies de fungos.	60
Tabela 5	Efeitos da concentração de conídios, extrato de levedura e tempo de incubação na diferenciação de apressório	68

RESUMO

Durante o processo de infecção, o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* desenvolve uma estrutura especializada denominada apressório. Essa estrutura é responsável por realizar pressão de turgor sobre a cutícula do hospedeiro para auxiliar na transposição desta barreira e instalar a infecção. Neste trabalho, a diferenciação de apressório foi induzida através de cultivo de conídios sobre lamínulas de vidro na presença de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. As melhores condições de cultivos determinadas foram de um meio contendo 0,0040% de extrato de levedura, concentrações de conídios por lamínula entre $2,5 \cdot 10^5$ e $5 \cdot 10^5$ e tempo de cultivo de 16 horas a 28°C. A sequência genômica de *emp1* foi isolada e apresentou uma ORF de 803 nucleotídeos codificando uma proteína predita de 226 aminoácidos. A proteína predita contém uma região N-terminal contendo um peptídeo sinal para secreção, um sítio potencial de N-glicosilação, 16 aminoácidos na porção C-terminal característicos de sítios de adição de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A massa molecular da proteína predita foi de 22KDa com um pI de 5,5. A sequência de *emp1* apresentou homologia com os genes das proteínas de matriz extracelular de *Fusarium oxysporum* (gene *fem1*) e de *Magnaporthe grisea* (gene *emp1*). Com base na sequência de *emp1* de *M. anisopliae* um vetor de interrupção foi construído e a seleção inicial dos transformantes foi conduzida.

ABSTRACT

The entomopathogenic fungi *Metharhizium anisopliae* develops specialized infection structures known as appressorium which trigger turgor pressure that is crucial for host penetration. In this work, the appressorium differentiation was induced in glass coverslips and the best nutritional condition (0.004% of yeast extract), time of growth (16 hours) and conidia concentration between $2.5 \cdot 10^5$ and $5 \cdot 10^5$ were optimized. Genomic DNA sequence of *M. anisopliae emp1* showing sequence homology to an extracellular matrix protein gene *fem1* of *Fusarium oxysporum* and *emp1* of *Magnaporthe grisea* was isolated. This sequence presents an open reading frame of 803 nucleotides encoding a predicted protein of 226 amino acids. The estimated molecular weight of the predicted protein product was 22 KDa with a pI of 5.5. It contains amino acid N-terminal secretion signal sequence, as well a potential N-glycosylation site. At its C-terminus, the protein contains a 16 amino acid sequence showing characteristics of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor addition signal. Based on this sequence a disruption vector was constructed with the *bar* cassette, allowing initial selections of mutants.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos utilizam estratégias bastante conservadas para infectar seus hospedeiros, incluindo alterações morfológicas, vias de sinalização celular e proteínas que auxiliam no desenvolvimento e protegem os fungos nos seus hospedeiros. Morfologicamente, ambos são capazes de realizar crescimento apical da hifa e transporem a cutícula (artrópode) ou a parede celular (planta) de seu hospedeiro através do desenvolvimento de estruturas de infecção especializadas (SEXTON & HOWLETT, 2006). O entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* realiza o processo de infecção desenvolvendo estruturas distintas, ao longo de seu desenvolvimento, denominadas conídio, hifa, apressório e blastosporos (CLARKSON & CHARNLEY, 1996).

O apressório é uma estrutura de penetração conservada em diversos grupos de fungos. Geralmente está localizada na extremidade distal do tubo germinativo e exerce pressão de turgor que auxilia na penetração da hifa através da superfície do hospedeiro (DEAN, 1997). St Leger *et al.*, (1989) descrevem a formação de apressório em *M. anisopliae* como um processo dependente da resposta dos conídios ao meio ambiente externo, podendo ser induzida *in vitro* em superfícies rígidas e hidrofóbicas lisas na presença de baixos níveis de fontes complexas de carbono. A etapa de formação do apressório é fundamental para a penetração e, portanto, para o estabelecimento da infecção. Assim, torna-se crucial o conhecimento dos mecanismos que a regulam para o entendimento do processo de patogenicidade. Em fungos fitopatogênicos, a formação de

apressório tem sido amplamente caracterizada, entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que regulam este processo em fungos entomopatogênicos.

Schoffelmer *et al.* (2001), purificaram e caracterizaram uma proteína do fungo *Fusarium oxysporum* covalentemente ligada a glicoproteínas da parede celular, denominada Fem1 (*Fusarium extracellular matrix protein*). A análise de similaridade *in silico* demonstrou homologia de Fem1 com outras proteínas preditas depositadas em bancos de dados, dentre elas, a do gene *emp1* do fungo *Magnaporthe grisea* e uma deduzida de uma sequência de cDNA incompleta de *M. anisopliae* ARSEF 2575 (AJ273721). Em 2004, Ahn *et al.* avaliaram a função do gene *emp1* em *M. grisea* e confirmaram o aumento dos níveis de transcrito deste gene em condições de formação de apressório quando comparados a condições de indução de conidiação e crescimento micelial. Mutantes nulos $\Delta emp1$ apresentaram redução na formação de apressório e na adesão de conídios a superfícies hidrofóbicas, indicando que o gene *emp1* desempenha um papel importante na formação do apressório, no reconhecimento da superfície e/ou na transmissão de sinais e, conseqüentemente, na patogenicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais do fungo filamentososo *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium é um gênero de fungos entomopatogênicos, classificado no filo Ascomycota, que abrange três espécies descritas, *Metarhizium album*, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae*. A espécie *Metarhizium anisopliae* divide-se em cinco variedades *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *dcjhyium* (DRIVER *et al.*, 2000; DONG *et al.*, 2009)

M. anisopliae apresenta micélio septado e hialino, com conidióforos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas (Figura1).

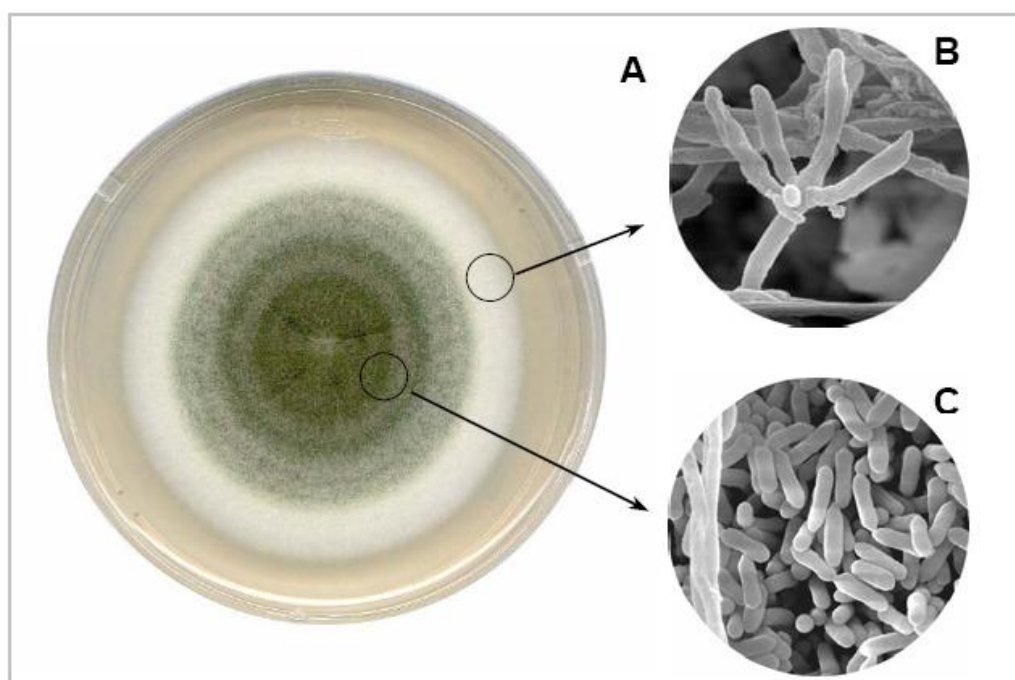


Figura 1: Características morfológicas de *Metarhizium anisopliae*. Colônia de *M. anisopliae* (A), Conidióforos (B), e conídios cilíndricos (C). A colônia foi fotografada em Meio MCc após 21 dias de cultivo a 28 °C. Em destaque fotomicrografias e Microscopia Eletrônica de varredura de conidióforo e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

Seu desenvolvimento vegetativo ocorre normalmente entre 15 e 32°C, sendo a faixa ótima de temperatura entre 25 e 30°C e pH de 6,9, podendo tolerar uma ampla variação de pH (de 2,0 a 8,5) (ARRUDA *et al.*, 2005; ARRUDA, 2005, ALVES, 1998). São conhecidas três formas de reprodução para este fungo, a reprodução assexuada, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo. A reprodução parassexuada, que envolve heterocariose e recombinação mitótica; e reprodução sexual. A forma teleomórfica para esse fungo seja dificilmente encontrada e foi somente descrita com o isolamento de *Cordyceps brittlebankisoides* (LIU *et al.*, 2001).

Capaz de infectar e matar mais de 300 espécies de artrópodes e mais de 50 famílias de insetos e ácaros (ST. LEGER, 2008), *M. anisopliae* vem sendo utilizado no controle biológico de insetos pragas da agricultura (PIRES *et al.*, 2009). No Brasil, o emprego de *M. anisopliae* teve grandes avanços, especialmente 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). Atualmente, vários estudos têm sido realizados para avaliar sua eficácia no controle de artrópodes vetores de doenças humanas e no controle de outras pragas da agricultura (Tabela 1).

Tabela 1: Possíveis hospedeiros do entomopatógeno *M. anisopliae*.

Hospedeiro suscetível	Cultura atingida/ hospedeiro ou doença transmitida	Referências
<i>Triatoma infestans</i>	Vetor do agente etiológico da doença de Chagas	LAZZARINI <i>et al.</i> , 2006; JUAREZ <i>et al.</i> , 2000; LUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>Anopheles gambiae</i>	Vetor do agente etiológico da malária	SCHOLTE <i>et al.</i> , 2006; KANZOK & JACOBS-LORENA, 2006
<i>Aedes aegypti</i>	Vetor do agente etiológico da dengue	LUZ <i>et al.</i> , 2008; SCHOLTE <i>et al.</i> , 2007
<i>Glossina</i> ssp	Vetores do agente etiológico da doença do sono	KAAYA & MUNYINYI, 1995
<i>Tuta absoluta</i>	Praga de folhas de tomate	PIRES <i>et al.</i> , 2009
<i>Capnotis tenebrionis</i>	Praga de frutos da família Rosaceae	MARANINNO <i>et al.</i> , 2006
<i>Haematobia irritans</i>	Agente etiológico da miíase em humanos e animais	ANGEL-SAHAGÚN <i>et al.</i> , 2005
<i>Tetranychus truncatus</i> , <i>T. turkestanii</i>	Praga do algodão	SHI <i>et al.</i> , 2008
<i>Peregrinus maidis</i> , <i>Delphacodes kuscheli</i> <i>Dalbulus maidis</i>	Vetores de parasitas do milho	TOLEDO <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Carrapatos que parasitam bovinos	FRAZZON <i>et al.</i> , 2003; LEEMON & JONSSON, 2008
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>Ixodes scapularis</i>	Carrapatos que parasitam bovinos	KAAYA <i>et al.</i> , 1996; HORNBOSTEL <i>et al.</i> , 2005
<i>Amblyomma variegatum</i>	Carrapatos que parasitam bovinos	KAAYA <i>et al.</i> , 1996; MARANGA <i>et al.</i> , 2005
<i>Nezara viridula</i> , <i>Euschistus heros</i> , <i>Piexodorus guildinii</i>	Pragas da soja	SOSA-GMEZ & MOSCARDI, 1998

Apesar de seu potencial como agente controlador de diversas pragas, a utilização de *M. anisopliae* mantém-se limitada devido a necessidade de um período de tempo maior para conduzir à morte efetiva de seu hospedeiro, quando comparado aos pesticidas químicos (ST LEGER *et al.*, 1996), além da dependência das condições ambientais que podem limitar seu desenvolvimento na superfície do inseto.

2.1.1. O processo de infecção de *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae realiza o processo de infecção através da penetração ativa da cutícula de seus hospedeiros. Este processo é multifatorial, dependente de características ambientais, da interação patógeno-hospedeiro, incluindo a topografia da epicutícula do hospedeiro e a secreção de enzimas hidrolíticas e toxinas (WANG & ST LEGER, 2005)

O ciclo de infecção de *M. anisopliae* é iniciado com a adesão dos conídios na superfície dos hospedeiros suscetíveis. Esta etapa é crucial para a patogenicidade e acontece via mecanismos hidrofóbicos mediados por proteínas presentes na superfície dos conídios que interagem com a camada lipídica da superfície dos hospedeiros, as hidrofobinas (FANG *et al.*, 2007). Substâncias adesivas também podem atuar nesta etapa, evitando que os esporos sejam removidos da carapaça do inseto por forças mecânicas naturais, como chuvas e vento. Wang & Leger (2006) relatam a proteína MAD1 como responsável pela adesão dos conídios na cutícula de *Manduca sexta*. Uma vez aderido, o conídio inicia a germinação sobre a cutícula do hospedeiro. Esse processo depende de condições favoráveis de temperatura, umidade, pH, oxigenação e disponibilidade

de nutrientes. Após a formação de tubo germinativo, ocorre o desenvolvimento, na extremidade distal das hifas, de uma estrutura dilatada denominada apressório.

O apressório é uma expansão na extremidade distal da hifa que exerce pressão de turgor sobre a cutícula do hospedeiro. Além de propiciar uma interação mais estreita entre a célula dos fungos e a cutícula do hospedeiro, o apressório é uma região onde pode ocorrer a secreção de enzimas que também auxiliam na penetração (WANG & LEGER, 2005). Essa estrutura será descrita detalhadamente na seção seguinte

Arruda *et al.* (2005) descrevem a diferenciação de apressório durante a infecção de *M. anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, evidenciando que esta estrutura apresentava-se de forma globosa com tamanho similar ao do conídio (Figura 2A), geralmente coberta por uma fina camada de mucilagem que a adere à superfície do carrapato (Figura 2B), e cercada por um halo de degradação presente na cutícula da carrapato (Figura 2C), , confirmando a secreção de enzimas neste local.

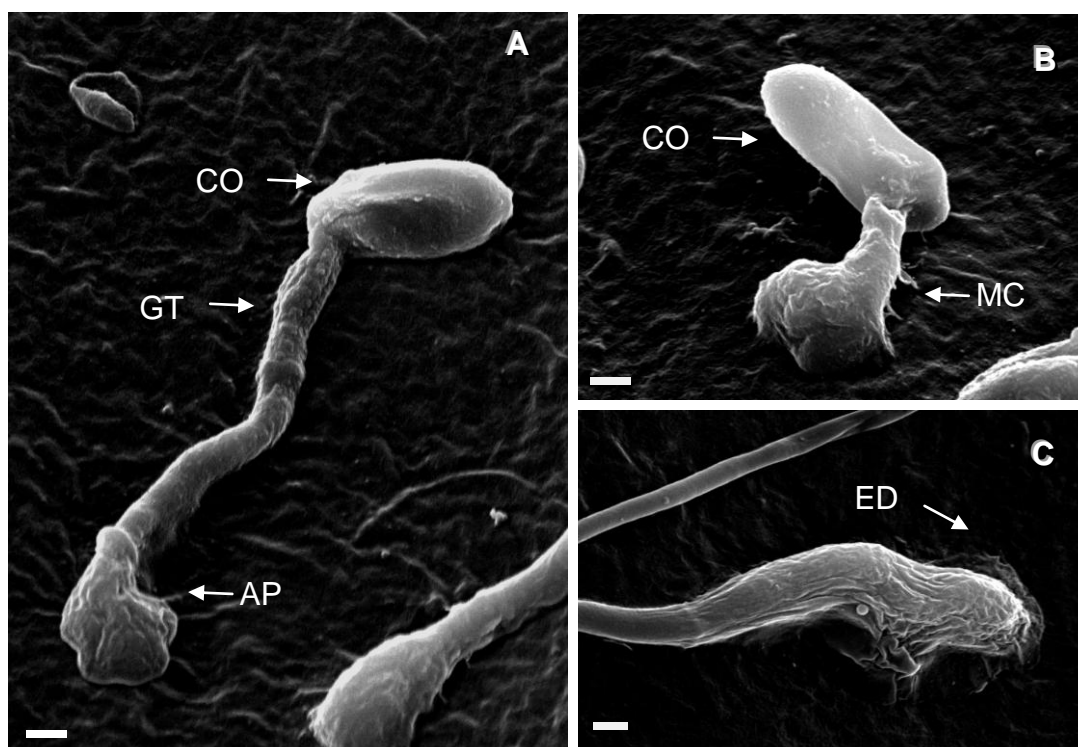


Figura 2: Diferenciação de apressório de *Metarhizium anisopliae* sobre a superfície do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Micrografias eletrônicas de varredura: (A) evidenciando a germinação de um conídio (CO), formando um tubo germinativo (GT), com diferenciação do apressório (AP); (B) presença de uma camada de mucilagem (MC); e (C) presença de um halo de degradação enzimática (ED) sobre a cutícula do carrapato. Barra: 2 μm (modificado de Arruda *et al.*, 2005)

Sequencialmente, ocorre a formação de estruturas conhecidas por grampos de penetração os quais são estruturas finas e alongadas, que se diferenciam na parede celular da superfície do apressório que está em contato com o hospedeiro (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Nessa etapa, várias enzimas hidrolíticas (proteases, quitinases e lipases) atuam sinergisticamente com a finalidade de dissolver a cutícula do hospedeiro, permitindo a penetração das hifas e o estabelecimento da infecção. Proteases e esterases parecem ser a primeiras enzimas a serem secretas com a posterior atuação de quitinases (PEDRINI *et al.*, 2007). As proteases são as enzimas mais estudadas em *M. anisopliae*, que é capaz de sintetizar proteases do tipo subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2), cisteína proteases (Pr4), metaloproteases e várias outras famílias de exopeptidases. Dentre essas proteases, destaca-se a protease Pr1A, que está relacionada à virulência e patogenicidade do fungo. Através da inserção de múltiplas cópias do gene *pr1A*, fusionadas a um promotor constitutivo, no genoma de *M. anisopliae*, pode-se evidenciar maior patogenicidade ao hospedeiro *Manduca sexta*, quando comparado à linhagem selvagem (ST LEGER *et al.*, 1996).

Mutantes espontâneos deficientes em Pr1A foram avaliados quanto a sua patogenicidade e mostraram-se menos virulentos (WANG *et al.*, 2002). Entretanto, essa redução de virulência parece ser hospedeiro dependente, sugerindo a secreção de diferentes proteases de acordo com o hospedeiro a ser infectado (BAGGA *et al.*, 2004)

Através da análise de expressão gênica global de uma linhagem de *M. anisopliae* cultivada em cutícula de *M. sexta* contra a mesma linhagem cultivada

em meio com privação de nutrientes, Freimoser *et al.* (2005) foram capazes de identificar um aumento da expressão das proteases Pr1A e Pr1B em meios com privação de nutrientes, evidenciando a expressão de ambas as proteases como uma resposta a estresse.

Quitinases têm sido caracterizadas em *M. anisopliae*, apresentando distintas atividades biológicas, como o envolvimento na morfogênese e na aquisição de nutrientes e o envolvimento durante o processo de infecção. (DA SILVA *et al.*, 2005). Após a penetração, as hifas atingem a hemocele do inseto e se diferenciam em estruturas unicelulares leveduriformes, os blastosporos. A formação destas células esféricas facilita a dispersão do fungo no corpo do hospedeiro através da hemolinfa, levando a uma infecção generalizada (BIDOCHKA *et al.*, 1997). A formação de blastosporos é influenciada pelo gene *cag8*, pois mutantes nulos mostraram redução na conidiação, na síntese de hidrofobinas e na formação de blastosporos. Nestes mutantes, os poucos blastosporos formados apresentaram alterações morfológicas (FANG *et al.*, 2007). Outro gene, cuja participação na formação de blastosporos foi demonstrada, é o gene *mad1*, cujos mutantes nulos também tiveram a formação de blastosporos reduzida (WANG & ST LEGER, 2006).

Na hemocele do inseto, o fungo deve resistir à resposta imunológica do hospedeiro e para tal, utiliza diversos mecanismos como: (i) a expressão de uma proteína semelhante a colágeno (MCL1) na superfície dos blastosporos, que impede o reconhecimento do fungo pelo sistema imune dos insetos (WANG & ST LEGER, 2006); e (ii) a secreção de toxinas, como as destruxinas, sendo algumas responsáveis por causar paralisia e outras por atividade imunossupressora nos

hospedeiros. Após a morte do inseto, o fungo se desenvolve saprofiticamente e produz uma grande quantidade de metabólitos secundários que podem auxiliá-lo na exclusão de microrganismos competidores pelos nutrientes do cadáver. Quando as fontes de nutrientes são exauridas, as hifas emergem através do tegumento para a superfície externa do hospedeiro ocorrendo então a esporulação do fungo e a liberação dos conídios (BUTT & MAGAN, 2001) A Figura 3 mostra de forma esquemática as diferentes etapas da infecção causada por *Metarhizium* em seus hospedeiros artrópodes.

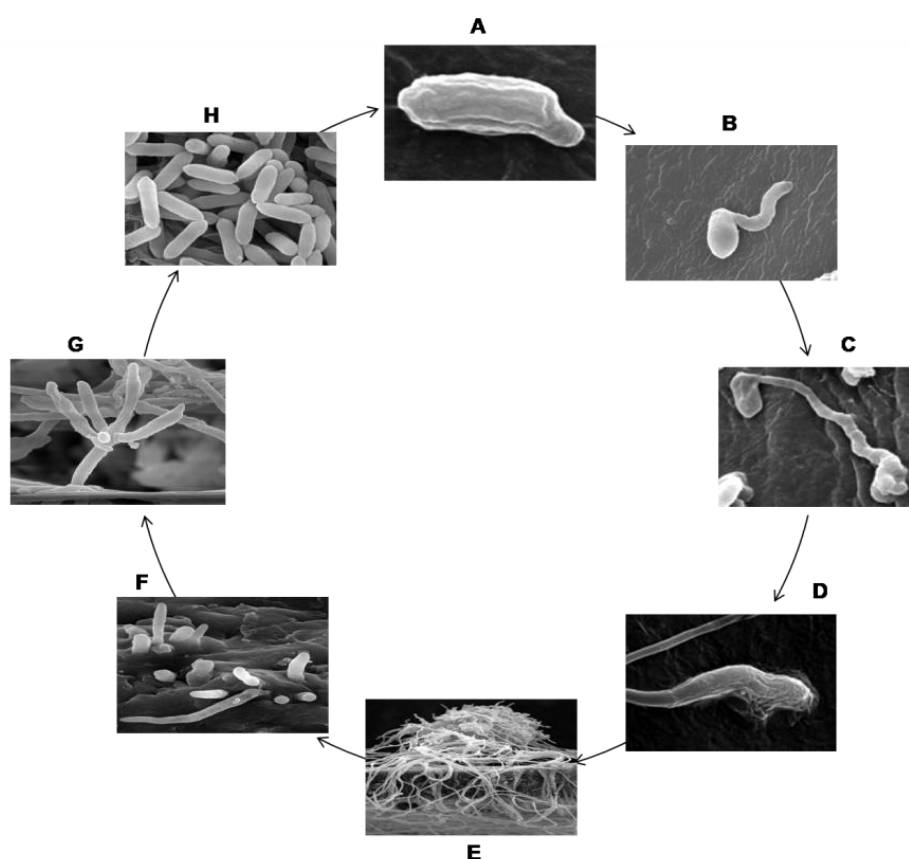


Figura 3: Ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae*. Etapas do ciclo de infecção no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por microscopia eletrônica de varredura (modificado de ARRUDA *et al.*, 2005). A) adesão; B) germinação; C) diferenciação em apressório; D) penetração; E) colonização; F) extrusão; G) reprodução; H) dispersão.

2.2. Diferenciação de apressório

O apressório (do latim, *apprimere* que significa realizar pressão sobre, pressionar) é uma estrutura evolutivamente conservada entre diversos grupos de fungos filamentosos, incluindo fitopatogênicos e entomopatogênicos. Suas características morfológicas podem ser variáveis mas, freqüentemente, encontra-se na forma de uma expansão, claramente definida, localizada na ponta do tubo germinativo das hifas. Sua diferenciação é um processo desencadeado especialmente por fatores físicos e químicos da superfície do hospedeiro, mas fatores ambientais como luminosidade, temperatura e umidade também podem influenciar (DEAN, 1997).

Com a finalidade de entender os mecanismos moleculares envolvidos na formação de apressório, vários estudos têm sido realizados para identificar a função de genes em fungos fitopatogênicos, mas pouco se sabe sobre esses mecanismos em fungos entomopatogênicos.

2.2.1. Apressório em fungos fitopatogênicos

A aplicação em larga escala do sequenciamento genômico tem fornecido um grande número de informações sobre aspectos relacionados a eventos de diferenciação celular e patogenicidade de diversos fungos. Atualmente mais de 40 genomas de fungos já foram publicados e, dentre eles, mais de 15 são de fungos fitopatogênicos que incluem *Ustilago maydes*, *Fusarium oxysporum* e *Magnaporthe grisea* (<http://img.jgi.doe.gov>, MARKOWITZ *et al.*, 2008). Causadores de grandes danos à agricultura, esses fitopatogênicos, especialmente *Magnaporthe grisea*, têm sido alvo de um grande número de pesquisas, especialmente no que se refere ao seu ciclo de infecção e os processos de diferenciação celular.

A formação de apressório é uma das etapas mais relevantes da diferenciação celular e, também, uma das mais estudadas nos fungos fitopatogênicos (DEAN, 1997). Atualmente, diversos trabalhos têm desvendado os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação de apressório desses fungos (WANG *et al.*, 2005).

Apesar dos avanços nas pesquisas realizadas com fungos entomopatogênicos, até o momento nenhum fungo entomopatogênico teve seu genoma completamente seqüenciado e pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação celular.

Sabe-se que os fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos apresentam uma conservação em vários mecanismos referentes à infecção. Sendo assim, optamos por realizar neste capítulo uma revisão sobre os dados referentes à formação de apressório em fungo fitopatogênicos.

2.2.1.1. Fisiologia da diferenciação de apressório

Uma das principais características do apressório é a realização de uma elevada pressão de turgor que auxilia o fungo na penetração de seu hospedeiro (HOWARD *et al.*, 1991). A pressão de turgor exercida pelo apressório de fungos fitopatogênicos pode chegar 8 MPa, a mais alta pressão já registrada em organismos vivos. A geração de turgor ocorre, geralmente, através do influxo de água contra um gradiente de concentração que é gerado pelo acúmulo de solutos presentes no apressório (WANG *et al.*, 2005). Através da extração dos componentes intracelulares do apressório e de experimentos de cromatografia líquida e gasosa, pode-se verificar que um dos principais solutos responsáveis pela pressão de turgor encontrada no apressório é o glicerol presente em altas concentrações, podendo chegar até 3M no interior da estrutura (DE JONG *et al.*, 1997).

O acúmulo de glicerol no apressório é geralmente gerado a partir da mobilização de estoques de carboidratos como manitol, glicogênio, lipídios e trealose. Thines *et al.* (2000) demonstraram que a síntese de glicerol, a partir de fontes de carboidrato, em *M. grisea*, é mediada pela atividade da enzima glicerol-3-fosfato dehidrogenase (GPD) dependente de NADH, bem como pela redução de dihidroxiacetona e gliceraldeído, ambos dependentes de NADH. O glicerol atua como um osmólito solúvel, causando rápido influxo de água para dentro do apressório, gerando pressão hidrostática.

O glicogênio é abundante nos esporos de fungos fitopatogênicos e é mobilizado rapidamente durante a germinação pela ação de duas enzimas principais, a glicogênio fosforilase e a amiloglicosidase. Esse processo acontece

rapidamente e, provavelmente, é uma das principais fontes de energia durante a extensão do tubo germinativo. Estudos de ultra-estrutura confirmam que o glicogênio está presente, na forma de rosetas, no citoplasma durante as primeiras etapas do desenvolvimento dos fungos e o seu desaparecimento precede a geração de turgor (BOURETT & HOWARD, 1990).

Durante a diferenciação celular, gotículas de lipídios são mobilizadas até o apressório e coalescem em um grande vacúolo de gordura central onde ocorre a lipólise. A mobilização de glicogênio e lipídios são processos dependentes da proteíno-quinase ativada por mitógenos (MAPK). Em *M. grisea*, a mobilização de glicogênio e lipídios não ocorre em mutantes nulos (Δ) *pmk1* (gene de uma MAPK), ocorre tardiamente em mutantes Δ *cpkA* (gene de uma subunidade catalítica da proteíno-quinase dependente de cAMP -PKA), e ocorre rapidamente em Δ *mac1 sum1-99* (mutante alterado por troca de leucina por arginina em um sítio de ligação de cAMP na subunidade regulatória de uma PKA) (WILSON & TALBOT, 2009).

A lipólise é um processo que ocorre com a ação de lipases triacilglicerol. A atividade dessas lipases libera glicerol diretamente dos ácidos graxos, mas o catabolismo de ácidos graxos através de β oxidação, que conduz a formação de acetil-CoA, é vital para a formação de apressório (WANG *et al.*, 2005). Visando investigar o papel da β oxidação de ácidos graxos na fisiologia do apressório Wang & St Leger (2007) geraram linhagens de *M. grisea* Δ *mpf1* (enzima multifuncional de β oxidação de ácidos graxos, localizada nos peroxissomos). Esses mutantes apresentaram incapacidade de utilizar lipídios ou ácidos graxos como fontes de carbono, tendo virulência atenuada. Entretanto o turgor no interior

do apressório dos mutantes não apresentava diferença significativa quando comparado com a linhagem selvagem, sugerindo que o soluto glicerol provavelmente não é gerado pela degradação de ácidos graxos em *M. grisea*. Além disso, os autores investigaram o papel da peroxina Pex6 (enzima responsável pela biogênese de peroxissomos) e constataram que as linhagens $\Delta pex6$ eram incapazes de infectar seus hospedeiro, devido à deficiência na biogênese de peroxissomos, essencial para a maturação de apressório, e apresentavam a formação de apressórios não melanizados. Os autores sugeriram que Acetil-coA derivados de ácidos graxos podem ser utilizados, por exemplo, em vias metabólicas secundárias como a biossíntese de melanina e poliquetídeos.

A importância da acetil-CoA para a maturação de apressório é também evidenciada pela observação de mutantes nulos para Pth2. Esta proteína é uma carnitina acetiltransferase, que converte acetil-CoA em acetil carnitina que participa no transporte de lipídios através da membrana peroxissomal. Os mutantes nulos para Pth2 perdem a sua patogenicidade e, no entanto não apresentam turgor reduzido nos apressório. Sendo o papel da Pth2 na fisiologia do apressório limitado à disponibilização de acetil-CoA na célula para a geração de melanina, glicanas e quitina (WILSON & TALBOT, 2009; WANG *et al.*, 2005).

A trealose (α -D-glucopiranosil – α - D- glucopiranosídeo) é um dissacarídeo encontrado abundantemente nos conídios, com função de armazenamento de carboidratos, e é rapidamente degradada durante a germinação dos esporos. Mutantes $\Delta tps1$ (trelose-6-fostafato sintase) não produzem trelose, mas germinam normalmente e formam a mesma quantidade apressório. Porém, a falta desta enzima provoca a redução do turgor da célula (PAUL *et al.*, 2008),

sugerindo que a trealose pode contribuir para o turgor do apressório. Neste caso o dissacarídeo agiria como um soluto compatível ou, ainda, como um agente protetor de membrana, permitindo à célula suportar a pressão hidrostática exercida em seu interior (FOSTER *et al.*, 2003).

2.2.1.2. Diferenciação de apressório e ciclo celular

No fitopatógeno *M. grisea* a diferenciação do apressório é um processo relacionado diretamente com a regulação do ciclo celular (CARACUEL-RIOS & TALBOT, 2007). Através da construção de uma linhagem de *M. grisea* expressando a Histona H3 – fusionada a GFP, foi possível visualizar o núcleo durante a formação de apressório e elucidar os processos celulares envolvidos nesta etapa. Veneault-Fourrey *et al.* (2006) demonstraram que o conídio germina a partir de uma única célula e um dos núcleos migra através do tubo germinativo em desenvolvimento, onde sofre mitose. Após a mitose, o núcleo originado migra até o apressório incipiente, enquanto os outros retornam até a célula do conídio e sofrem posterior degeneração. O cultivo de conídios na presença de nutrientes exógenos que inibiam a formação de apressório mostrou que a mitose ocorria tardiamente e os núcleos presentes no conídio não se degeneravam. No mesmo trabalho, foi avaliada a mitose em mutantes $\Delta pmk1$ (proteína quinase ativada por mitógeno) que eram incapazes de formar apressório. Esses mutantes sofriam divisões nucleares sucessivas no tubo germinativo, entretanto não ocorreu o colapso do núcleo nos conídios. Utilizando-se hidroxíureia e benomil para bloquear a transição da progressão celular da fase G1/S ou de G2/M do ciclo celular, respectivamente, a mitose foi inibida no tubo germinativo e o

desenvolvimento de apressório não ocorreu, evidenciando que a mitose, a migração nuclear e a morte celular, por autofagia do conídio do qual a infecção se originou, são fundamentais para a diferenciação do apressório (VENEULT-FOURREY *et al.*, 2006)

2.2.1.3. Vias de sinalização celular envolvidas na diferenciação de apressório

A diferenciação de apressório em fungos fitopatogênicos é muito influenciada pela topografia da folha do hospedeiro e pelo reconhecimento e resposta a sinais específicos do ambiente externo. Alguns estudos sugerem que fatores topográficos da superfície do hospedeiro sejam mais importantes para desencadear a formação de apressório do que componentes químicos. Experimentos com folhas artificiais de silicone e plástico, mimetizando detalhadamente folhas de plantas, são capazes de induzir a formação de apressório de vários fungos *in vitro*. Alguns fitopatogênicos como *Uromyces appendiculatus* têm a formação de apressório induzida sobre folhas artificiais plásticas quando suas hifas encontram estruturas que mimetizam o relevo das células guarda de estômatos. No entanto, fitopatogênicos como *Magnaporthe grisea* e *Colletotrichum gloeosporioides* não necessitam de estímulos topográficos e respondem a estímulos da superfície de contato, como hidrofobicidade e rigidez. Além disso, estudos recentes têm evidenciado a presença de monômeros de cutina como um importante elemento de ativação de proteíno-quinases que estão envolvidas na sinalização celular e conseqüente diferenciação de apressório

(SKAMNIOTI & GURR, 2007; DICKMAN *et al.*, 2003). Essas diferenças podem estar relacionadas com a especificidade do fungo aos hospedeiros (DEAN, 1997).

Os mecanismos utilizados por fitopatógenos para reconhecer os estímulos que conduzem à formação de apressório parecem ser bastante complexos e seu entendimento ainda é limitado. Todavia, alguns mecanismos têm sido identificados. Um dos primeiros mecanismos estudados foi o mecanismo *mecanoreceptor* ou receptor de toque, que evidencia canais de cátions na membrana plasmática de *Uromyces appendiculatus* envolvidos na sinalização topográfica. Zhou *et al.* (1991), sugerem que a topografia da superfície da folha, como os relevos das células guarda que compõe o estômato dos hospedeiros, poderia causar um estresse na membrana das células do patógeno, resultando em um influxo de íons incluindo íons de cálcio que, então, desencadearia a formação do apressório.

A expressão aumentada de genes de calmodulinas (proteínas ligadoras de cálcio) pelo contato com superfícies altamente hidrofóbicas e outras condições indutoras da formação de apressório, além de estudos com RNA antisense com genes de calmodulinas resultantes em redução da formação de apressório, podem evidenciar o importante papel do cálcio no processo de diferenciação celular de *Colletotrichum gloeosporioides* (UHN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 1998). Choi *et al.* (2009), realizaram a análise funcional do gene codificante de uma subunidade catalítica de calcineurina (MCNA) em *M. oryzae*. Através da construção de mutantes expressando senso/antisense RNA de MCNA, pode-se observar uma redução de crescimento do micélio, na conidiação, na formação de apressório e na patogenicidade do fungo em folhas de arroz.

As integrinas, proteínas conservadas em diversos grupos de organismos, responsáveis pela adesão e pelo reconhecimento de sinais extracelulares, em mamíferos, leveduras e plantas, têm sido estudadas com relação a seu papel na diferenciação celular de fungos fitopatogênicos. A atividade das integrinas é mediada por outras proteínas de matriz extracelular e pode ser inibida por peptídeos cujos domínios são compostos pelos aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD). Correa *et al.* (1996) demonstraram que a formação de apressório, quando estimulada por contato com superfícies rígidas e hidrofóbicas, pode ser inibida por certos peptídeos RGD em *U. appendiculatus*. Bae *et al.* (2007) avaliaram o efeito de anticorpos (HFA) que impedem as integrinas de se ligarem aos seus domínios (proteínas de matriz extracelular) e peptídeos RGD em *M. oryzae* e puderam concluir que tanto HFA como RGD são capazes de reduzir consideravelmente os níveis de adesão e de formação de apressório. Os efeitos provocados por RGD foram restaurados com a adição de AMP cíclico (cAMP). Este trabalho sugere o envolvimento de proteínas de matriz extracelular na adesão dos conídios, bem como na formação de apressório, através de receptores de integrinas e sinalização celular dependente de cAMP.

Choi & Dean (1997) isolaram e caracterizaram em *M. grisea* o gene *macI*, de uma adenilato ciclase, enzima que catalisa a produção de cAMP. Mutantes $\Delta macI$ não foram capazes de formar apressório em condições indutoras e foram incapazes de penetrar em folhas de arroz. No entanto, a adição de cAMP exógeno foi capaz de restaurar a formação de apressório e a patogenicidade, evidenciando o envolvimento da sinalização celular mediada por cAMP no desenvolvimento, na diferenciação celular e na patogenicidade do fungo.

O cAMP exerce sua atividade principalmente através da ativação da proteíno-quinase dependente de cAMP (PKA). A ligação de cAMP conduz a dissociação de uma proteína tetramérica em duas subunidades monoméricas e um dímero de subunidades regulatórias. A subunidade catalítica ativa a cascata de fosforilação ou pode migrar diretamente para o núcleo e fosforilar fatores de transcrição (DEAN, 1997). Em *Magnaporthe grisea*, a adição de cAMP é capaz de induzir a formação de apressório em condições não indutoras, como, por exemplo, o cultivo em superfícies hidrofílicas. Mitchell & Dean (1995), através da disrupção do gene *cpkA* responsável pela síntese de uma subunidade catalítica de proteíno-quinase, demonstraram que proteíno-quinase dependente de cAMP é necessária para a formação de apressório e patogenicidade. Em *Colletotrichum lagenarium*, a análise por deleção do gene RPK1, uma subunidade regulatória de PKA, indicou que a correta regulação desta proteína é necessária para a formação de apressório (TAKANO *et al.*, 2001).

Em células eucarióticas, proteíno-quinase ativadas por mitógenos (MAPK) estão envolvidas em cascatas de sinalização de estímulos extracelulares, regulação do crescimento e processos de diferenciação celular (ZHAO *et al.*, 2005).

Em *M. grisea*, diferentes MAPK tem sido identificadas, incluindo Pmk1 (*Pathogenicity MAP-Kinase 1*), envolvida na patogenicidade do fungo, Mps1 (*MAP kinase for penetration and sporulation*), envolvida na penetração e esporulação, e OSM1 (*Osmoregulation MAP kinase*), envolvida na regulação osmótica (XU, 2000).

Pmk1 é uma proteína homologa a Fus3/Kss1 de *Saccharomyces cerevisiae*, ativada pela MAPK quinase (MAPKK) Mst7, que é ativada, por sua vez, pela MAPKK quinase (MAPKKK) Mst11. Mutantes $\Delta pmk1$ de *M. grisea*, apesar de reconhecerem e responderem a superfícies hidrofóbicas ou presença de cAMP exógeno, apresentaram-se incapazes de formar apressório e não são patogênicos quando em contato direto com folhas de arroz (XU & HARMER, 1996). As linhagens mutantes para os genes $\Delta mst7$ e $\Delta mst11$ mostram-se incapazes de formar apressório e de colonizar os tecidos das folhas (ZHAO *et al.*, 2005).

A proteína Mst11 apresenta um motivo N-terminal (SAM) e interage com a proteína Mst50, contendo o mesmo tipo de motivo. Os mutantes $\Delta mst50$ apresentam-se incapazes de formar apressório, são sensíveis ao estresse osmótico e não patogênicos. A complementação dos mutantes $\Delta mst50$ com o alelo dominante *mst7* é capaz de restituir a formação de apressório, mas não a patogenicidade. Mst50 interage diretamente com as proteínas Mst7 e Mst11 e essa interação parece ser essencial para a formação de apressório. Além dessas proteínas, Mst50 interage também com Ras1, Ras2, Cdc42 e Mgb1, que devem transmitir diferentes sinais em resposta aos estímulos ambientais, e regular o desenvolvimento de apressório (PARK *et al.*, 2006). Sequências homólogas às da proteína Pmk1 foram isoladas e caracterizadas como fundamentais para o processo de formação de apressório em mais outros três fungos: *C. lagenarium*, *Cochliobolus heterostrophus* e *Pyrenophora teres* (KOJIMA *et al.*, 2002; RUIZ-ROLDAN *et al.*, 2001; TAKANO *et al.*, 2001; LEV *et al.*, 1999).

A ativação da MAPK Pmk1 é mediada pela resposta da proteína heterotrimérica G a estímulos físicos da superfície do hospedeiro, como hidrofobicidade e rigidez (WILSON & TALBOT, 2009). Três genes que codificam subunidades α da proteína G foram isolados em *M. grisea* e são eles, *magA*, *magB* e *magC*. Contrária à disrupção de *magB*, a disrupção de *magA* e *magC* não ocasionou nenhum efeito na formação de apressório ou patogenicidade. Entretanto, mutantes inativados para o gene *mgb1* de uma subunidade β da proteína G, foram defectivos para a formação de apressório, penetração e crescimento infeccioso. A indução de apressório em mutantes $\Delta mgb1$ pode ser realizada através da adição de cAMP. Esses experimentos sugerem que esta subunidade da proteína G possa estar envolvida em múltiplos papéis na morfogênese do fungo durante o processo de infecção e que esse mecanismo deve estar integrado as vias de sinalização envolvendo AMP e MAPK (NISHIMURA *et al.*, 2003).

A proteína Rgs1 interage com as três subunidades α da proteína G em *M. oryzae*, MagA, MagB e MagC. Rgs1 interage ativamente com a forma ativa de MagA durante o início da formação de apressório, regulando negativamente a atividade de GTP-MgA dependente de adenilato ciclase. Mutantes $\Delta rgs1$ acumulam elevados níveis de cAMP. MagB deve ser necessária para a suprimir a formação de apressório em superfícies não indutora e deve realizar o papel de regulação negativa da adenilato ciclase nessas condições (WILSON & TALBOT, 2009).

Através de experimentos de mutagênese em *M. grisea*, foi possível identificar o gene *pth11* responsável pela patogenicidade do fungo que codifica

uma proteína transmembrânica. Os mutantes $\Delta pth11$ são capazes de formar apressório em uma frequência de 10 a 15% quando comparados com a linhagem selvagem, e também são capazes de germinar e formar uma expansão túrgida na ponta da hifa, tanto em superfícies hidrofóbicas quanto hidrofílicas, sugerindo que Pth11 não é necessária para a morfogênese do apressório mas, sim, para o reconhecimento da superfície do hospedeiro, podendo ativar a diferenciação de apressório em resposta a estímulos de superfícies indutoras e pode reprimir a diferenciação em superfícies pouco indutoras (DEZWAAN *et al.*, 1999).

Wilson & Talbot (2009) elaboraram o diagrama mostrado na Figura 4 que resume o conhecimento acumulado sobre as possíveis vias de sinalização celular envolvidas na diferenciação de apressório no fitopatógeno *M. grisea*.

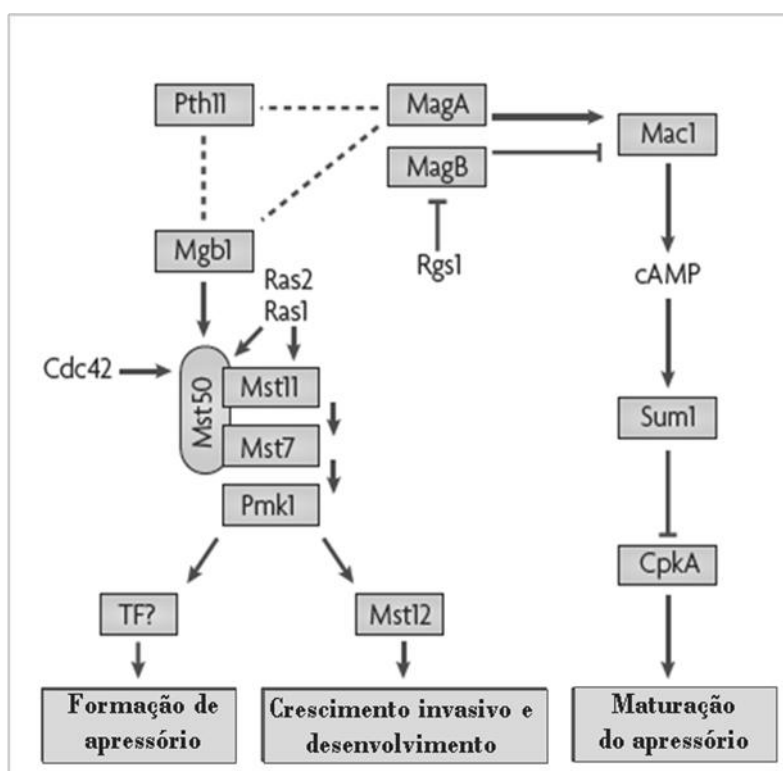


Figura 4: Via de sinalização necessária para infecção e desenvolvimento de *Magnaporthe oryzae* (modificado de WILSON & TALBOT, 2009)

2.2.2. Apressório em fungos entomopatogênicos

Um grande de número de fungos entomopatogênicos é capaz de realizar a diferenciação de apressório (Tabela 2).

Tabela 2: Fungos entomopatogênicos capazes de realizar diferenciação de apressório.

Fungo entomopatogênico	Referência
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ST LEGER <i>et al.</i> , 1989
<i>Metarhizium flavoviride</i>	XAVIER-SANTOS <i>et al.</i> , 1999
<i>Beauveria bassiana</i>	TALAEI-HASSANLOUI <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus parasiticus</i>	ST LEGER <i>et al.</i> , 1989
<i>Paecilomyces farinosus</i>	GÖKÇE & KUBILAY, 2005.
<i>Coelomomyces psorophorae</i>	ST LEGER <i>et al.</i> , 1989
<i>Conidiobolus obscurus</i>	ST LEGER <i>et al.</i> , 1989
<i>Neozygites fresenii</i>	ST LEGER <i>et al.</i> , 1989
<i>Alternaria alternata</i>	HATZIPAPAS <i>et al.</i> , 2002

M. anisopliae é um dos fungos entomopatogênicos mais estudados. No entanto, pouco se sabe de sobre a fisiologia e os mecanismos moleculares que controlam a diferenciação celular. Embora os estudos nessa área ainda sejam bastante limitados em fungos entomopatogênicos, acredita-se que exista conservação entre mecanismos pelos os quais os fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos se diferenciam.

St Leger *et al.*(1989) padronizaram a indução da diferenciação de apressório *in vitro*, concluindo que, para tal, é necessário o contato do fungo com superfícies rígidas e hidrofóbicas (quando maior a hidrofobicidade maior o grau de

diferenciação) em presença de baixas concentrações de compostos nitrogenados. Atualmente, sabe-se que os estímulos externos, necessários para a formação de apressório, podem variar de acordo com a linhagem do fungo. Em linhagens capazes de infectar um grande número de hospedeiros, como *M. anisopliae* var. *anisopliae*, a diferenciação de apressório pode ser induzida como demonstrado por St Leger *et al.*(1989). Já em linhagens hospedeiro-específicas como a *M. anisopliae* var. *acridum* (específica para acridídeos), apenas a cutícula do hospedeiro (gafanhoto) é capaz de estimular o desenvolvimento completo da germinação e diferenciação celular (WANG & ST. LEGER, 2005).

Em 2007, Wang & Leger isolaram um gene de *M. anisopliae* de uma perilipina *Mpl1* estruturalmente semelhante à de mamíferos. Mutantes $\Delta mpl1$ apresentavam hifas finas, poucas gotas de lipídios e um decréscimo de lipídios particularmente no apressório. Além disso, observaram uma drástica redução de turgor, indicando que lipídeos são necessários para o acúmulo de solutos. Acredita-se que a concentração de *Mpl1* controle a geração de turgor e a diferenciação de apressório, regulando a degradação de triacilgliceróis e consequente produção de glicerol. Devido à deficiência de turgor no apressório, os mutantes $\Delta mpl1$ eram incapazes de transpor a cutícula de *Manduca sexta*, confirmando a atuação desse gene como um determinante de virulência.

O silenciamento de *mos1* (*Metarhizium osmosensor like protein*), gene de um osmosensor responsável pela resistência de *M. anisopliae* a ambientes com grande osmolaridade, como a hemolinfa, gerou linhagens com menor tolerância à pressão osmótica, deficiência na síntese de parede celular, germinação alterada dos conídios e apressório defectivo. Além disso, o mutante *mos1-antisense*

apresentou os níveis de transcritos dos genes *mad 1*, *so*, *mpl1* e *hsp70* alterados, quando comparado com o selvagem (WANG *et al.*, 2008)

A expressão de *mpl1* é normalmente regulada negativamente em linhagens selvagens de *M. anisopliae*, permitindo o acúmulo de glicerol nas células, entretanto, em linhagens *mos1-antisense*, a expressão de *mpl1* foi regulada positivamente, reduzindo a habilidade do aumento de pressão osmótica intracelular em resposta ao estresse osmótico (WANG *et al.*, 2008; WANG & ST. LEGER, 2007).

Linhagens de transformantes *mos1-antisense* também produziram um grande percentual de hifas ramificadas e multicelulares, o mesmo efeito observado em mutantes $\Delta mad1$, o que pode ser explicado pela redução do nível de transcritos de *mad1* nos transformantes *mos1-antisense* (WANG *et al.*, 2008)

O gene *so* codifica uma C4-metil esterol oxidase e é um importante componente na biossíntese de ergosterol, o composto responsável pela permeabilidade da membrana celular e rigidez. A regulação positiva de *so* na linhagem selvagem implica em um decréscimo de permeabilidade e um aumento de rigidez em condições de estresse osmótico. No transformante *mos1-antisense* a regulação negativa de *so* sugere uma redução na habilidade de controlar a permeabilidade da membrana e rigidez (WANG *et al.*, 2008; BARD *et al.*, 1996).

Fang *et al.* (2009) isolaram o gene *mpka1* (*Metarhizium anisopliae* protein kinase A 1) da subunidade catalítica de uma proteíno-quinase e, através de inativação gênica, puderam observar o papel dessa proteína na patogenicidade do fungo. O mutante $\Delta mpka1$ apresentou virulência reduzida e deficiência na formação de apressório. Através de análise comparativa (*microarray*) dos

transcritomas do mutante $\Delta mpka1$ e da linhagem selvagem, foi possível identificar 244 genes regulados negativamente e um gene regulado positivamente (*pr1D*) na linhagem $\Delta mpka1$. Os genes identificados incluem genes envolvidos na formação de grampos de penetração, degradação de cutícula, regulação de pH, síntese de lipídeos, controle do ciclo celular e aquisição de nutrientes na formação de apressório. Entre os genes relacionados com a formação de apressório regulados negativamente encontram-se genes envolvidos na síntese de ergosterol. O ergosterol influencia a permeabilidade da célula ao glicerol em condições de estresse osmótico e a disfunção em sua síntese pode contribuir para a redução da pressão de turgor no apressório.

2.3. Proteínas da matriz extracelular

A parede celular dos fungos, normalmente composta por quitina, β -1,3- e β -1,6-glicana, mananas e proteínas, é uma estrutura que confere forma à célula, controla a permeabilidade celular, protege a célula contra alterações osmóticas, é a estrutura de interação com o meio externo, e é também onde se localizam as adesinas e um grande número de receptores celulares. Na composição da parede celular os polissacarídeos e os peptidopolissacarídeos são especialmente relevantes, sendo muitos deles compostos imunologicamente ativos com grande potencial de regulação na patogênese e na resposta imune do hospedeiro. As proteínas e glicoproteínas que compõem a camada mais externa da parede celular, ou proteínas da matriz extracelular, podem estar ligadas covalentemente à matriz de polissacarídeos por ancoras de GPI (glicosilfosfatidilinositol). Essa classe de proteínas que contem GPI é encontrada tanto em organismos eucariotos

superiores como inferiores e desempenha funções na adesão celular, na interação e sinalização celular patógeno-hospedeiro, na expansão da parede celular e na formação de apressório (LATGÉ, 2007).

As seqüências de proteínas que são modificadas pela adição de GPI têm em comum a presença de um peptídeo sinal N-terminal que participa na translocação através do retículo endoplasmático e uma região hidrofóbica na sua porção C-terminal que é precedida por três resíduos de aminoácidos chamados de ω , $\omega+1$ e $\omega+2$ (GERBER *et al.*, 1992). O sítio ω é normalmente ocupado por resíduos de aspargina, glicina, ou serina, entretanto há uma tolerância com relação a outros aminoácidos. Não há restrição quanto à composição do sítio $\omega+1$; entretanto, o sítio $\omega+2$ pode ser ocupado somente por resíduos de glicina, alanina ou serina. A adição do sinal GPI ocorre quando, no retículo endoplasmático, a proteína sofre uma proteólise entre os sítios ω e $\omega+1$ seguida da adição de GPI ao novo resíduo C-terminal, dando origem a uma proteína de parede celular modificada por GPI. Esta proteína é, então, transportada para a membrana plasmática, pela via de secreção de onde é liberada para ligar-se covalentemente a uma molécula de β -1,6-glicana da parede celular (LU *et al.*, 1995). Essas proteínas também se caracterizam por apresentarem uma alta percentagem de resíduos de serina e treonina que são sítios de O-glicosilação e N-glicosilação e fornecem às proteínas um dobramento correto para uma correta exposição do domínio N-terminal e estabilidade (JENTOFT, 1990).

Visando investigar a estrutura da parede celular de fungos filamentosos fitopatogênicos, Schoffemeer *et al.* (2001) caracterizam uma glicoproteína covalentemente ligada à parede celular de *Fusarium oxysporum*. A proteína de

212 aminoácidos foi designada Fem1 (*Fusarium oxysporum extracellular matrix protein*). Como esperado para uma proteína de matriz extracelular, Fem1 apresentou 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 característicos como sítios de adição de GPI. Além disso, através de buscas em bancos de dados, pode-se inferir que sequências homólogas a de Fem1 podiam ser encontradas em outros fungos como *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* e em *Metarhizium anisopliae*.

Em 2004, Ahn *et al.* isolaram e caracterizaram a proteína homóloga a Fem1 em *M. grisea* denominando-a Emp1. Essa proteína de 207 aminoácidos contém 18 aminoácidos na região N-terminal como sinal de secreção, quatro potenciais sítios de N-glicosilação, 16 aminoácidos na região C-terminal com características sinalizadoras de adição de GPI. Foram gerados mutantes nulos para o gene *emp1* que exibiam baixos níveis de diferenciação de apressório e patogenicidade, sem efeito no crescimento micelial com capacidade de conidiação. Esses experimentos sugeriam que Emp1 desempenhava um papel importante na formação de apressório em *M. grisea*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Visando ampliar os conhecimentos sobre o processo de infecção do entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* nosso objetivo neste trabalho foi Analisar a função do gene *emp1* no processo de diferenciação de apressório de *Metarhizium anisopliae*.

3.2. Objetivos específicos

Padronização das condições indutoras da diferenciação de apressório em *M. anisopliae* linhagem E6.

Isolar e caracterizar o gene *emp1* de *M. anisopliae*.

Construir um vetor de inativação do gene *emp1* de *M. anisopliae*.

Construir uma linhagem de *M. anisopliae* inativada para o gene *emp1*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

4.1.1. Meio de Cove (MC)

Nitrato de sódio	0,6% (m/v)
Glicose	1% (m/v)
Ágar	1,5% (m/v)
Solução de Sais	2% (v/v)
Solução de elementos traços	0,004% (v/v)

4.1.2. Meio de Cove completo (MCc)

Nitrato de sódio	0,6% (m/v)
Glicose	1% (m/v)
Caseína hidrolisada	0,05% (m/v)
Extrato de levedura	2% (m/v)
Peptona	0,2% (m/v)
Ágar	1,5% (m/v)
Solução de Sais	2% (v/v)
Solução de elementos traços	0,004% (v/v)

4.1.3. Solução de Sais

KCl	2,6% (m/v)
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,6% (m/v)

KH_2PO_4 7,6% (m/v)

4.1.4. Solução de elementos traços

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004% (m/V)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04% (m/V)

FeSO_4 0,001% (m/V)

$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,08% (m/V)

$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,08% (m/V)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08% (m/V)

4.1.5. Meio LB (Luria- Bertani)

Triptona 1% (m/v)

Extrato de levedura 0,5% (m/v)

NaCl 1% (m/v)

4.1.6. Meio Indutor (IM)

Glicose 0,18% (m/v)

Glicerol 0,5% (m/v)

KH_2PO_4 0,058% (m/v)

K_2HPO_4 0,082% (m/v)

NaCl 0,0006% (m/v)

MgSO_4 0,02% (m/v)

CaCl_2 0,00026% (m/v)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,02% (m/v)

MÊS 40 mM (m/v)

4.2. Microrganismos e condições de cultivo

4.2.1. Linhagem de *Metarhizium anisopliae*

O fungo filamentoso entomopatogênico *M. anisopliae* var. *anisopliae*, isolado E6, isolado de *Deios flavopicta* (Hemoptera, Cercopidea) no Estado do Espírito Santo, gentilmente cedido 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.

4.2.1.1. Suspensão de esporos

Esporos de *M. anisopliae* foram coletados a partir de culturas em placas de Petri em meio MCc sólido incubadas a 28°C por sete dias. Com o auxílio de alça de Drigalsky e 10 mL de solução de Tween 80 0,001%. A suspensão obtida foi lavada duas vezes com água destilada estéril e centrifugada (5.000 g durante 15 min). Os esporos foram suspensos em água destilada estéril e contados em Câmara de Neubauer. As suspensões foram estocadas a 4°C e utilizadas por no máximo duas semanas.

4.2.2. Linhagem de *Escherichia coli*

Foi utilizada a linhagem TG2 como hospedeira do vetor pUC18 e sua manutenção foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) líquido conforme previamente descrito (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.2.3. Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

A linhagem de *A. tumefaciens* EHA105 foi utilizada nos experimentos de Agro-transformação. A preparação de células quimiocompetentes foi realizada de acordo com protocolo previamente descrito (HOLSTERS *et al.*, 1978).

4.3. Transformação de *Metarhizium anisopliae* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (CONVERT *et al.*, 2001)

Para a transformação de *M. anisopliae* mediada por *A. tumefaciens*, um pré-inóculo de *A. tumefaciens* foi 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 do meio IM em uma concentração de 0,15 OD₆₆₀. As células foram cultivadas à 28 °C com agitação de 180 RPM até a obtenção de OD₆₆₀ igual a 0,45. Alíquotas de 100 µL dos cultivos em IM 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 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.

4.4. Manipulação e isolamento de DNA

DNA genômico de *M. anisopliae* foi isolado de acordo com Bogo *et al.*, 1996. A seqüência parcial de *emp1* foi obtida pela metodologia de *Genome Walking* (RISHI *et al.*, 2004). As bibliotecas de DNA foram construídas de acordo com as instruções do fabricante (Universal GenomeWalker™ Kit – Clontech). DNA de *M. anisopliae* foi completamente digerido com a utilização de enzimas de restrição capazes de gerar extremidades cegas, PvuII, SmaI, StuI e RsaI. Após a purificação, o produto das digestões foi ligado ao adaptador *GenomeWalker* com utilização da T4 DNA ligase. Os fragmentos de DNA ligados aos adaptadores (bibliotecas de *GenomeWalker*) foram utilizados como molde para a reação primária de PCR. Os ciclos utilizados para a amplificação foram: 94 °C por 5 minutos e 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 30 segundos; 68 °C por 2 minutos e 1 ciclo final de 68 °C por 5 minutos. A reação primária de PCR foi diluída 50 vezes e utilizada como molde para uma reação de PCR secundária com a utilização de oligonucleotídeos de seqüências a jusante dos utilizados durante a reação primária. A amplificação foi realizada conforme descrito anteriormente, mas em 20 ciclos.

Para a realização da hibridização de DNA (*Southern blot*), alíquotas de DNA (30µg/amostra) foram digeridas a 37 °C pelas enzimas StuI, PvuII, PstI, KpnI, HindIII e EcoRI. As amostras digeridas foram fracionadas em um gel de agarose 0,8% e transferidas para uma membrana de náilon Hybond™-N+ (Amersham, Pharmacia). O produto da amplificação da porção 5' do fragmento de cDNA (AJ273721), obtido com os oligonucleotídeos (*empF1* e *empR1*), foi utilizado como sonda. A marcação e hibridização da sonda e sinais de detecção

foram realizados utilizando-se *AlkPhos Direct Labeling and Detection System* de acordo com as instruções do fabricante (Amersham). Os sinais de hibridização foram visualizados através da exposição das membranas a filmes de autoradiografia (Kodak X-Ray).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência
EmpSF1	5' AATACCAACCTTAAGGACTAC 3'
EmpSR1	5' TTAACCGAGATAACCGAGAG 3'
EmpSF2	5' GAGGGCGTTGTTTCTGGCAC 3'
EmpSR2	5' AACGAAAGCCATGGGAGTGG 3'
Emp5'F	5' GAATTCTGCGTAGTTGCTCTTGCCAC 3'
Emp5'R	5' CTGCAGAAGAGTGATGGTGCAGCCGC 3'
Emp3'F	5' CTGCAGTTTGGAACTTGGTATGCTAAC 3'
Emp5'F	5' AAGCTTGTGGTGGCGGCGGTGGTA 3'
BarF	5' CCATGGCCATGAGCCCAGAACGAC3'
BarR	5' GGATCCTCAGATCTCGGTGACGGG -3'

4.5. Clonagem e sequenciamento do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae*

A seqüência de *emp1* de *M. anisopliae*, obtida através de *GenomeWalking kit* (Clontech), foi clonada no sítio de *SmaI* do vetor pUC18 e a seqüência de nucleotídeos foi determinada utilizando-se *Dye terminator kit* (GE Healthcare) com o seqüenciador Megabace 1000. Análises de identidade de nucleotídeos foram realizadas utilizando-se o algoritmo BLAST no GenBank.

4.6. Indução da diferenciação de apressório de *Metarhizium anisopliae*

Concentrações de conídios de 1.10^6 e 5.10^5 esporos/mL foram inoculadas em placas de Petri de 24 poços com fundo plano e diâmetro de 16,2 mm, com adição de 500 μ L de água suplementada com concentrações variáveis entre 0,0125% e 0,0040% de extrato de levedura, sobre lamínulas redondas (Knittel Gläser) estéreis. O cultivo foi realizado entre 12-16 horas a 28 °C. Para verificar a formação de apressório as lamínulas foram dispostas sobre lâminas de vidro e examinadas em microscópio óptico com os aumentos de 400 ou 630X.

4.7. Montagem do cassete de inativação do gene *emp1* (pPZP: *bar*: *emp1*)

Para a construção do cassete de inativação do gene *emp1* (pPZP:*bar*:*emp1*) foi realizada a amplificação das porções 5' (408 pb) e 3' (503 pb) do gene e da marca de seleção (cassete de expressão do gene *bar* - 3648 pb) (STAATS et al, 2007) e posterior clonagens *blunt* dos respectivos fragmentos em sítio de *Sma*I do vetor pUC18. O vetor pUC18: 3' foi clivado com as enzimas *Pst*I e *Hind*III para liberação da porção 3' de *emp1* que foi subsequentemente clonada no vetor pUC18: 5' foi clivado com as enzimas de restrição *Pst*I e *Hind*III, resultando no vetor pUC18:5':3' onde foi inserido o cassete do gene *bar* no sítio de *Pst*I. O vetor pUC18: 5':*bar* : 3' foi clivado com *Eco*RI e *Hind*III e clonado nos sítios de *Eco*RI e *Hind*III do vetor binário pPZP201BK (CONVERT et al, 2001) (Figura 5).

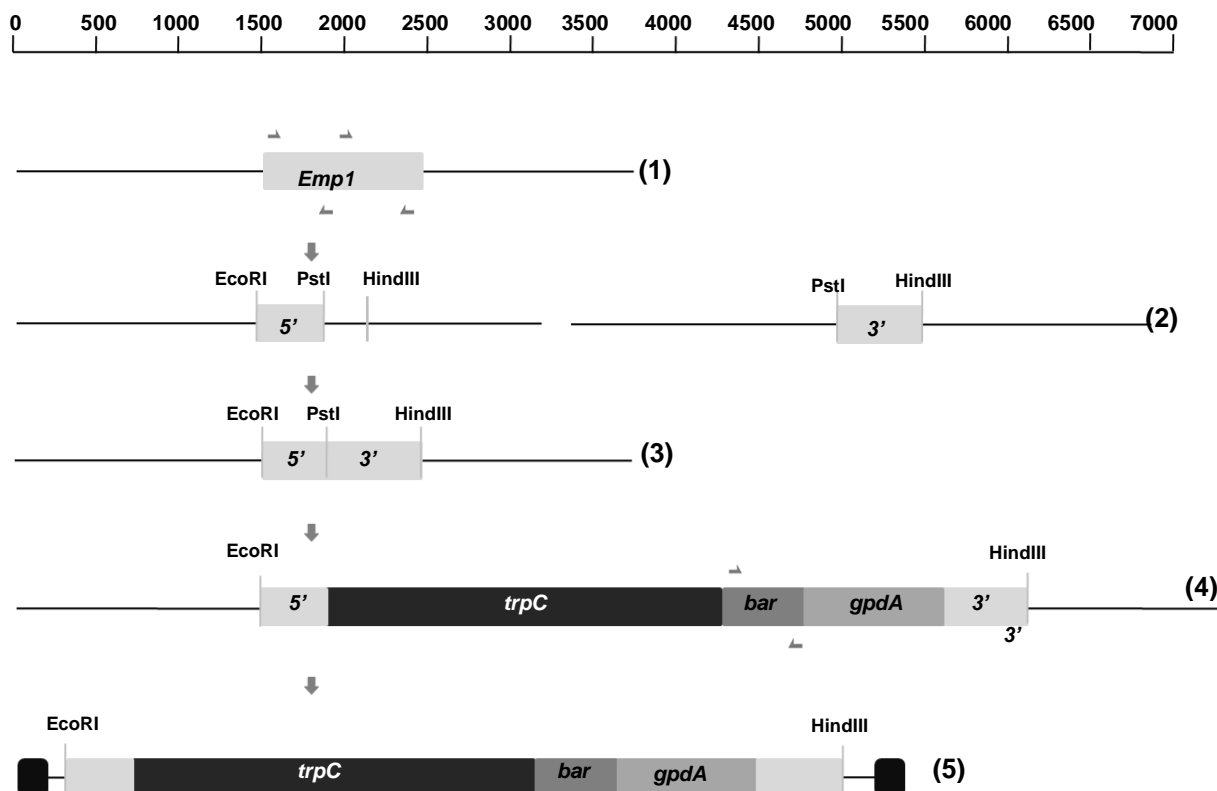


Figura 5: Montagem do cassete de inativação *bar: emp1* para *Metarhizium anisopliae*. (1) sequência de *emp1* isolada pelos oligonucleotídeos 5'_empF e 3'_emp1R (barra grossa em cinza claro) clonada em vetor pUC18 (barra fina em preto).. (2) Fragmento 5'(408 pb) do gene, amplificado com os oligonucleotídeos 5'_emp1F e 5'_emp1R (barra grossa em cinza claro), clonado no sítio de *SmaI* do vetor pUC18 (barra fina em preto). e fragmento 3'(503 pb) do gene, amplificado com os oligonucleotídeos 3'_emp1F e 3'_emp1R (barra grossa em cinza claro), clonado no sítio de *SmaI* do vetor pUC18 (barra fina em preto). (3) Fragmentos 3' (barra grossa em cinza claro)' clonado no vetor pUC18 (barra fina em cinza escuro) contendo o fragmento 5', nos sítios de *EcoRI* e *HindIII*. (4) Cassete de resistência a glifosinato de amônio composto por *gpd* (promotor do cassete *bar* – cinza médio), *bar* (gene de resistência a glifosinato de amônio – cinza escuro), *trpC* (terminador do cassete *bar* – preto), clonado no sítio de *PstI* do vetor pUC18 entre a porção 5' e 3' de *emp1*. (5) Cassete de inativação de *emp1* (pPZP:*bar:emp1*) clonado entre os sítios de *EcoRI* e *HindIII* do vetor pPZP201BK, internos à BE (borda direita do plasmídeo pPZP201BK) e BD (borda direita do plasmídeo pPZP201BK).

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e caracterização da seqüência do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae*

A metodologia de *Genome Walking* envolve a determinação gradual de seqüências de DNA que flanqueiam uma região de seqüência conhecida. Esta técnica se baseia na clivagem *blunt* do DNA genômico, dando origem as bibliotecas de DNA, posterior ligação de adaptadores às bibliotecas, seguida de reações de PCR utilizando oligonucleotídeos gene-específicos e oligonucleotídeos que se ligam aos adaptadores, possibilitando, assim, a amplificação da região de interesse. (GUO & XIONG, 2006). Neste trabalho, essa metodologia foi eficiente para o isolamento de *amplicons* com tamanho máximo de aproximadamente 1,1 Kb (correspondente à reação de amplificação realizada com a biblioteca gerada com a enzima de restrição PvuII e com os oligonucleotídeos gene específico Emp1R e Emp2R). Esse *amplicon* ($\pm 1,0$ Kb) foi obtido na reação primária e confirmado na reação secundária de *Genome Walking*.

Os outros *amplicons* que apresentaram tamanhos inferiores a 1Kb, ou eram produtos de amplificação inespecífica, não foram utilizados (Figura 6).

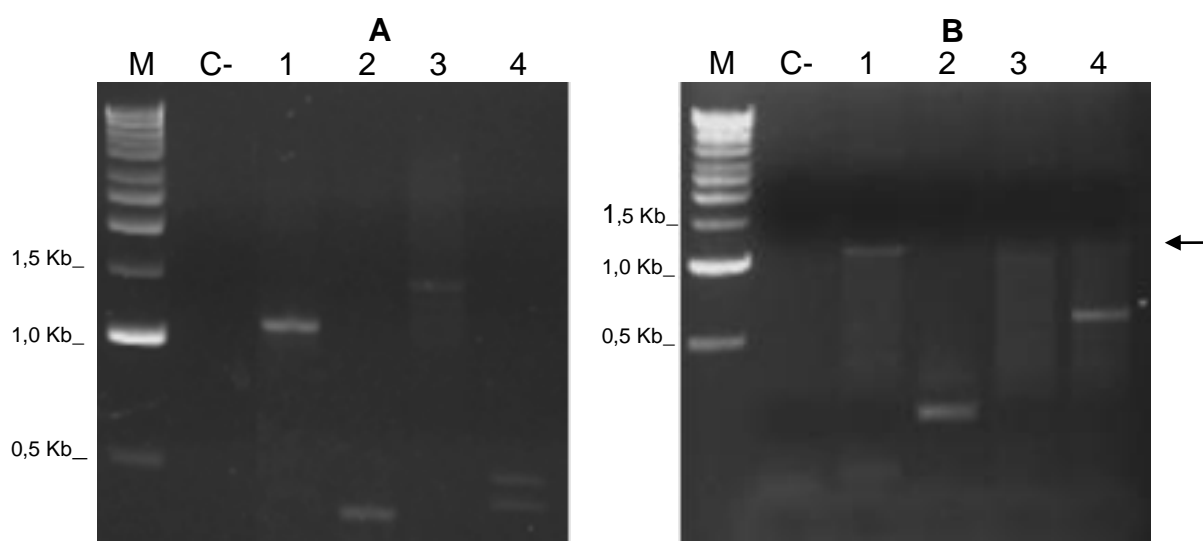


Figura 6: Produtos da amplificação das bibliotecas de DNA genômico de *Metarhizium anisopliae*. (A) reação primária, (B) reação secundária. *Amplicons* obtidos através da utilização dos oligonucleotídeos universais de GenomeWalker e gene-específios. M (marcardor); C- (controle negativo); 1 (amplificação da biblioteca clivada com PvuII); 2 (amplificação da biblioteca clivada com RsaI); 3 (amplificação da biblioteca clivada com SmaI); 4 (amplificação da biblioteca clivada com PstI). A seta indica o amplicon que foi selecionado.

O *amplicon* de 1110 pb, isolado à partir das reações de PCR, foi clonado em vetor pUC18 e então completamente seqüenciado. A comparação da seqüência deste *amplicon* com seqüências depositadas no GenBank permitiu a identificação de seqüências relativas ao gene *emp1*. A Figura 7 mostra a comparação entre a seqüência do *amplicon* identificado neste trabalho (1100 pb) e a seqüência incompleta de cDNA de *M. anisopliae* depositada no GenBank (AJ273721). Como pode ser observado, o *amplicon* caracterizado neste trabalho expande a seqüência previamente depositada no Genbank no sentido da região promotora do gene *emp1*.

```

emp1      : GCTTAGCCTACATTGGTCTCGCACGGTTTTAGAACACACCCCTAGCTGGGTAAAgGCAGCTGCGTAGTTGCTCTTGCCA : 80
AJ273721 : ----- : -

emp1      : CTTGCTTTAGGCGAGCCAACCTGGCAGCTCCAAGTGTCTCGTATTCTCGCGCCAATCGACATTTGGCGACATTTGGCAACA : 160
AJ273721 : ----- : -

emp1      : TTTAAAGCTGGCTTGGCTTTGACTCGTCTGCTACGAATAAATCCAAGACAGGGGCCGATGACATTGATGCAAAGATCTTC : 240
AJ273721 : ----- : -

emp1      : TTGCTGACTAGCGTTTTGTTTGACAGTTTGCACACTTTCACAGTCATTCGCAGATTACCGTTTTTCGAAATGAAGTACGCT : 320
AJ273721 : ----- : -

emp1      : CTCGTTATTTTCAGCTTTGGCTGCTCTGGCCGCCGCCGCGGAAAAGCCCAAGTTCCTCAACAGCAACTTCCAGATTACCGA : 400
AJ273721 : ----- : -

emp1      : GGGCCAGTCATTCGATCTCAAGTTCGACGGCTGTGAGGGCGGCTGCACCATCACTCTTCAGGACGGTCCC AATACCAACC : 480
AJ273721 : ----- AATACCAACC : 10
                                     AATACCAACC

emp1      : TTAAGGACTACAAGGTTATTTCCA GTAAGTTTGCATCCATGCTGAGCAGATGTGTTTGAACCTGTATGCTAACATCCTC : 560
AJ273721 : TTAAGGACTACAAGGTTATTTCCA ----- : 34
                                     TTAAGGACTACAAGGTTATTTCCA

emp1      : GTAGCTAGCGCGACCGGCGTCTCTCGCCTGGGTCCCGAGGGCGTGTGTTTCTGGCACCTATGCCTTCAAGATCACCAA : 640
AJ273721 : ----CTAGCGCGACTGGCGTCTCTCGCCTGGGTCCCGAGGGCGTGTGTTTCTGGCACCTATGCCTTCAAGATCACCAA : 110
                                     CTAGCGCGAC GCGGTTCTCTCGCCTGGGTCCCGAGGGCGTGTGTTTCTGGCACCTATGCCTTCAAGATCACCAA

emp1      : CAAGGCCAACAAAGGAGTACAACACTATCTCAACAGTTCCTCCTACCTCGGCACCTGGAGCTAGCGTACCGCTTCTGCCGCCA : 720
AJ273721 : CAATGCCAACAAAGGAGTACAACACTATCTCAACAGTTCCTCCTACCTCGGCACCTGGAGCTAGCGTACCGCTTCTGCCGCCA : 190
                                     CAA GCCAACAAAGGAGTACAACACTATCTCAACAGTTCCTCCTACCTCGGCACCTGGAGCTAGCGTACCGCTTCTGCCGCCA

emp1      : GCACGACTGGCTCTTCGACCGGCTCCGCTACTGCTACTGCTACTGCTTCCTCTACTGAGGCGTCTCCACTGTCAGCATC : 800
AJ273721 : GCACGACTGGCTCTTCGACCGGCTCCGCTACTGCTACTGCTACTGCTTCCTCTACTGAGGCGTCTCCACTGTCAGCATC : 264
                                     GCACGACTGGCTCTTCGACCGGCTCCGCTACTGCTACTGCT TCCTCTACTGAGGCGTCTCCACTGTCAGCATC

emp1      : ACTGCGAGCAGCAGGAGAGCTCTACTGAGAGCGGAACCGCGAGCACCACCATTTCTACCGTACCCAGCTCTGCCACCAC : 880
AJ273721 : ACTGCGAGCAGCAGGAGAGCTCTACTGAGAGCGGAACCGCGAGCACCACCATTTCTACCGTACCCAGCTCTGCCACCAC : 344
                                     ACTGCGAGCAGCAGGAGAGCTCTACTGAGAGCGGAACCGCGAGCACCACCATTTCTACCGTACCCAGCTCTGCCACCAC

emp1      : GGCCAGCGGCTCTTCCACCCTTCGCGCCCTTCTCCGGACTTGTGAGCAAAACACTTTTGATCTAAAATCAGACGACG : 960
AJ273721 : GGCCAGCGGCTCTTCCACCCTTCGCGCCCTTCTCCGGACTTGTGAGCAAAACACTTTTGATCTAAAATCAGACGACG : 388
                                     GGCCAGCGGCTCTTCCACCCTTCG CGCCCTTCTCCGGACTT

emp1      : AATTATCCGCTAACCACCTTCTACGCAGCCCATTCATCTACTTCCACCAGATCTACCACCGCCGCCACCACCCTGTTC : 1040
AJ273721 : -----CCCATTCATCTACTTCCACCAGATCTACCACCGCCGCCACCACCCTGTTC : 440
                                     CCCATTCATCTACTTCCACCAGATCTACCACCGCCGCCACCACCCTGTTC

emp1      : CAACGCTGGTGTCCGGGCCACTCCCATGGCTTTGCTTGCAAGCGCCGTTGGG-GCTCTCGCTTATCTCGGT----- : 1110
AJ273721 : CAACGCTGGTGTCCGGGCCACTCCCATGGCTTTGCTTGCAAGCGCCGTTGGAGCTCTCGCTTATCTCGGTAAACCTCGG : 520
                                     CAACGCTGGTGTCCGGGCCACTCCCATGGCTTTGCTTGCA GCGCCGTTGC GCTCTCGCTTATCTCGGT

emp1      : ----- : -
AJ273721 : TCACGAATAAACGAGATGGGTAT : 543

```

Figura 7: Identificação da sequência de *emp1* de *Metarhizium anisopliae* isolada por *Genome Walking*. São mostradas (*emp1*), a sequência isolada neste trabalho com *amplicon* de 1100 pb e (AJ273721), a sequência de cDNA depositada no GenBank. A terceira linha em cada comparação representa a sequência consenso. A marcação em preto mostra as sequências homólogas e em cinza, a divergência. Os traços são incluídos para maximizar o alinhamento e representam sequências ausentes. Os intróns encontram-se em caixas cinzas. O alinhamento foi obtido com o programa GeneDoc (NICHOLAS *et al.*, 1997).

A sequência do gene *emp1* isolada neste trabalho, contém 470 pb a montante do sítio de origem da tradução (ATG), dois prováveis íntrons, um de 60 e outro de 65 pb respectivamente, e uma *ORF* de 678 pb. A posição dos íntrons foi estabelecida pela comparação da sequência de DNA genômico de *emp1* isolada neste trabalho com a sequência de cDNA depositada no GenBank (AJ273721). As sequências de íntrons encontradas no gene *emp1* apresentaram conservação com a sequência consenso determinada para íntrons em fungos nos sítios de *splice* 5' [GTA (Y/A) GT (AC)], sítios de *splice* 3' [(A/C) (C/T) AG] e o sítio de *splicing* interno [(T/A) (G/A) CT (A/G) AC] (BALLANCE, 1986). A *ORF* prediz uma proteína de 226 aminoácidos com estimativa de uma massa molecular de 22 KDa e ponto isoelétrico (pI) de 5,5.

Como o esperado para proteínas de matriz extracelular ancoradas por GPI, a proteína Emp1 predita contém peptídeo sinal correspondente a 16 aminoácidos hidrofóbicos na região N-terminal. A porção C-terminal apresenta um sítio de ancoramento de GPI. Emp1 contém alta porcentagem (29,7%) de resíduos de serina e treonina que são potenciais sítios para ligações O-glicanas e, como em proteínas de matriz extracelular de leveduras, a porção C-terminal de Emp1 anterior ao sítio de ancoramento de GPI é também rica em serina e treonina. Pode-se verificar também a presença de um provável sítio de N-glicosilação (Figura 8).

```

1 GCTTAGCCTACATTGGTCTCGCACGGTTTTAGAACACACCCTAGCTTGGGTAAAGGCAG 60

61 CTGCGTAGTTGCTCTTGCCACTTCGTTTAGGCGAGCCAACCTGGCAGCTCCAAGTGCTCGT 120

121 ATTTCTGCGGCCAATCGACATTTGGCGACATTTGGCAACATTTAAAGCTGGCTTGC GTTT 180

181 GACTCGTCTGCTACGAATAAATCCAAGACAGGGGCCGATGACATTGATGCAAAGATCTTC 240

241 TTGCTGACTAGCGTTTTGTTTGACAGTTTGACACACTTCACAGTCATTTCGCAGATTACCGT 300

301 TTTTCGAAatgaagtacgctctcgttatttcagctttggctgctctggccgcccgcgcccg 360
1 (M K Y A L V F S A L A A L A) A A A E 18

361 aaaagcccaagttcctcaacagcaacttccagattaccgagggccagtcattcgatctca 420
19 K P K F L N S N F Q I T E G Q S (E 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 ttaaggactacaaggttatttccaGTAAGTTTGCATCCATGCCTGAGCAGATGTGTTTGA 540
59 K D Y K V I S 65

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

601 agggcggttgtttctggcacctatgccttcaagatcaccaacaacgccaacaaggagtaca 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 gcacgactggctcttcgaccggctccgctactgctactgctactgcttccctctactgagg 780
119 T T G S S T G S A T A T A T A S S T E A 138

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

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

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

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

1021 gccgccaccaccactgttcccaacgctggtgtccgcgccactcccatggcttccggttgca 1080
197 A A T T T V P (N A G) V R A T P M A F V A 216

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

```

Figura 8: 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 sinal N-terminal para secreção está marcado por retângulo pontilhado abaixo da sequência. O sinal de adição de GPI está marcado com com uma linha grossa abaixo da sequência e a parte hidrofóbica do motivo está marcada por uma linha fina abaixo da sequência.

A análise *in silico* da sequência isolada neste trabalho, pode evidenciar a similaridade da proteína predita de *emp1* com as proteínas Fem1 de *Fusarium oxysporum* (SCHOFFELMEER *et al.*, 2001), Emp1 de *Magnaporthe grisea* (AHN *et al.*, 2004), com a proteína predita de um clone de cDNA de *M. anisopliae* (AJ273721) e com uma sequência de *Neurospora crassa* (CAE76327). O alinhamento destas sequências é mostrado na Figura 9.

```

Ma Emp1 : MKYAL-V-ISALAALAAAAEKPKFLNSNFQITEGQSEDLKFDGCEGGCTI : 48
cMa Emp1 : ----- : -
Fo Emp1 : MKYTL-ATIAALASVALA--KPAFLNTEFDLTEGKPYTIRYSGCDDGCTI : 47
Mg Emp1 : MKFTLSACVAVLAAIAEA--RVQFTNSNFVVEAGKPFELTWSGATGPVTI : 48
Nc Emp1 : MKFSL-AAVSAFVAYALA--KPAITNTDFNIQEGVDYTLKWKDATAPITI : 47

Ma Emp1 : TLQDGPNTN-LKDYKVIKTSATGG--SLAWVPEGVVSQTYAFKITN-NAN : 94
cMa Emp1 : -----NTN-LKDYKVIKTSATGG--SLAWVPEGVVSQTYAFKITN-NAN : 40
Fo Emp1 : VLQNGPSDD-LSDYKTLTTSATGD--SFTFTPELPSDTYNFKITD-KAG : 93
Mg Emp1 : SLKDGPSSTN-LRTVETLVSNASGGKATVTLTASQIKSGTYAFGIKD-TSG : 96
Nc Emp1 : TLMTGPDADHMTPFKTIASGVITGD--SYTWTPELVPSQTYAFKIADGDSK : 95

Ma Emp1 : KEYNYSQQFSYLGTGASVTASAASTTGSSTGSATATATASSTEASSTVSI : 144
cMa Emp1 : KEYNYSQQFSYLGTGASVTASAASTTGSSTGSATAT--ASSTEASSTVSI : 88
Fo Emp1 : -EVNYSAQFPYKGSYA----APSVTKSATATAETTAVASTKEATTLASV : 137
Mg Emp1 : EPENYSQQFNIVGTGL-----ASTTASGTTTAASTTAASTTASSTASSTLST : 140
Nc Emp1 : ADENYSVREPYVGSAAATTG-ASSTLSTVTKTSTSTMVSSSTVESSTIVS- : 143

Ma Emp1 : TASSTESSTESGTASTTISTVTSSATTASGSSTTSPSSATSHSSTSTRS : 194
cMa Emp1 : TASSTESSTESGTASTTISTVTSSATTASGSSTTSPSSATSHSSTSTRS : 138
Fo Emp1 : TKSAEETTT---VAKPIIPT-----HAPSKNATTPAAHPTPSKTGSAG : 178
Mg Emp1 : TARPTAANVSS-TASST-----ANSSSTAARTSATSTPAST-TAS : 178
Nc Emp1 : --SSAASSTD---ASSTVTSV-----ASSAATTTTTSSTHAASSTAS : 182

Ma Emp1 : TTAATTTVPNAG-V-RATP-MAFVAGAVAALAYLG : 226
cMa Emp1 : TTAATTTVPNAG-V-RATP-MAFVAXAVAS-SRLS : 169
Fo Emp1 : GETSVPSVPESG-AARMTSSLALIAGAVMAMVYLN : 212
Mg Emp1 : -----SPPNTGAGSQLQSSLALVFLGAAAYVFLN : 207
Nc Emp1 : --APTNSPPNTNNAERFASPLALILGTVAALVFFN : 215

```

Figura 9: Alinhamento da proteína Emp1 de *Metarhizium anisopliae* com seqüências de proteínas ortólogas. As seqüências utilizadas para o alinhamento foram: a seqüência predita da proteína Emp1 de *M. (etarhizium) a(nisopliae)* descrita nesse trabalho; a proteína predita da seqüência de c (DNA) de *M. (etarhizium) a(nisopliae)* depositada no GenBank AJ273721 a seqüência de

Fem1 de *F(usarium) o(xysporum)* (SCHOFFELMEER *et al.*, 2001) AF450092; a sequência de Emp1 de *M (agnaporthe) g(risea)* (AHN, *et a.l.*, 2004) AY429471; e a sequência de *N(eurospora) c(rassa)* CAE76327.

Através de buscas em bancos de dados utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*,1997; NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pode-se verificar que a proteína predita de *emp1* apresenta homologia com outras sequências de proteínas de matriz extracelular e proteínas ricas em serina e treonina como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Valores de identidade e similaridade para o alinhamento da sequência predita de aminoácidos da proteína de matriz extracelular Emp1 com as proteínas ortólogas de espécies de fungos.

Microrganismo/ Número de acesso	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Magnaporthe grisea</i> / AAR06609	41	65
<i>Fusarium oxysporum</i> / AAL47843)	41	59
<i>Neurospora crassa</i> / CAE76327	42	58
<i>Coccidioides posadasii</i> / ABA38724	39	55
<i>Talaromyces stipitatus</i> / EED3397	33	51
<i>Penicillium marneffeii</i> / EEA18635	32	48
<i>Aspergillus clavatus</i> / EAW12884	27	47
<i>Aspergillus fumigatus</i> / EAL91602	26	42
<i>Neosartorya fischeri</i> / EAW17793	26	43

Em cinza estão as proteínas definidas como proteínas de matriz extracelular e em branco as proteínas extracelulares ricas em serina e treonina.

Para estabelecer o número de cópias do gene *emp1* em *M. anisopliae*, foi procedida a análise por *Southern* de DNA genômico. A Figura 10 mostra o

resultado deste experimento de hibridização que evidencia a copia única do gene *emp1*.

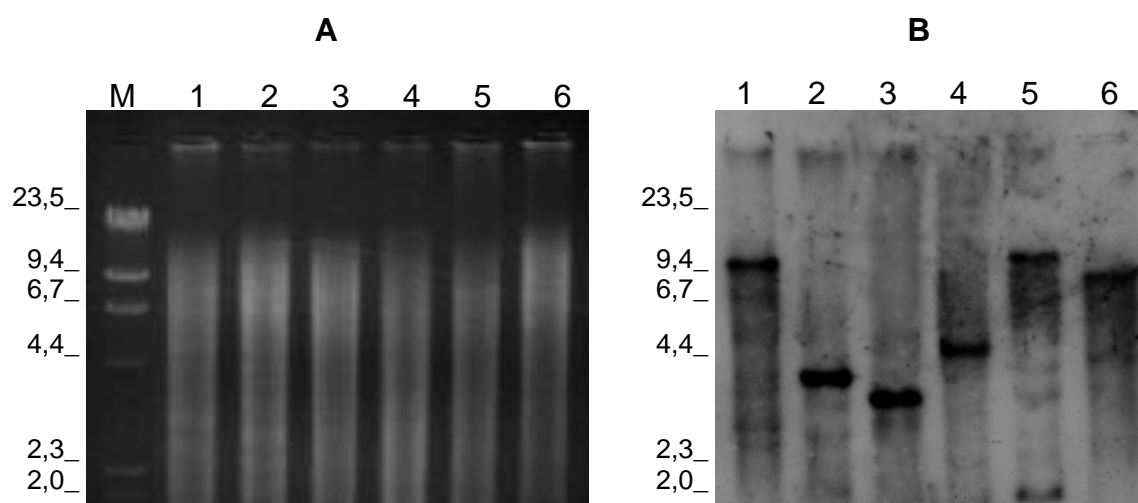


Fig. 10: Determinação do número de cópias do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae*. Em (A), eletroforese em gel de agarose 0,8% e em (B) Autoradiografia da membrana hibridizada, utilizando-se como sonda um fragmento de 500 pb do gene. O DNA foi digerido com as enzimas Stul (1); PvuII (2); PstI (3); KpnI(4); HindIII (5); EcoRI (6) e em (M) encontra-se o marcador.

5.2. Padronização da diferenciação de apressório *in vitro* por *M. anisopliae*

A padronização da diferenciação de apressório de *M. anisopliae* linhagem E6, foi realizada sobre lamínulas de vidro, sendo avaliadas as concentrações de extrato de levedura entre 0, 0125% e 0, 0040% e as concentrações de conídios entre $2, 5 \cdot 10^3$ e $5 \cdot 10^6$ esporos/mL. As melhores condições para ambas as variáveis (concentração de extrato de levedura e concentração de esporos), foram avaliadas em dois tempos de cultivo, 12 e 16 horas. Todos os experimentos foram realizados a 28 °C.

De acordo com os ensaios realizados, foi possível determinar as concentrações $1,0 \cdot 10^6$ e $5,0 \cdot 10^5$ conídios/mL como as mais adequadas para a indução da diferenciação de apressório por *M. anisopliae* (Figura 13 A e B). Quando cultivado em concentrações de conídios inferiores a $5 \cdot 10^4$ esporos/ mL

(2, $5 \cdot 10^4$ esporos por lamínula) em 0,0125% ou 0,0060% de extrato de levedura por 12 horas, *M. anisopliae* não foi capaz de formar apressório (Figura 11 e Figura 12). Na concentração de $5 \cdot 10^6$ esporos/mL ($2,5 \cdot 10^6$ esporos por lamínula), *M. anisopliae* apresentou uma redução de aproximadamente 50% da germinação e formação de apressório de apenas 20% dos conídios (Figura 13 C).

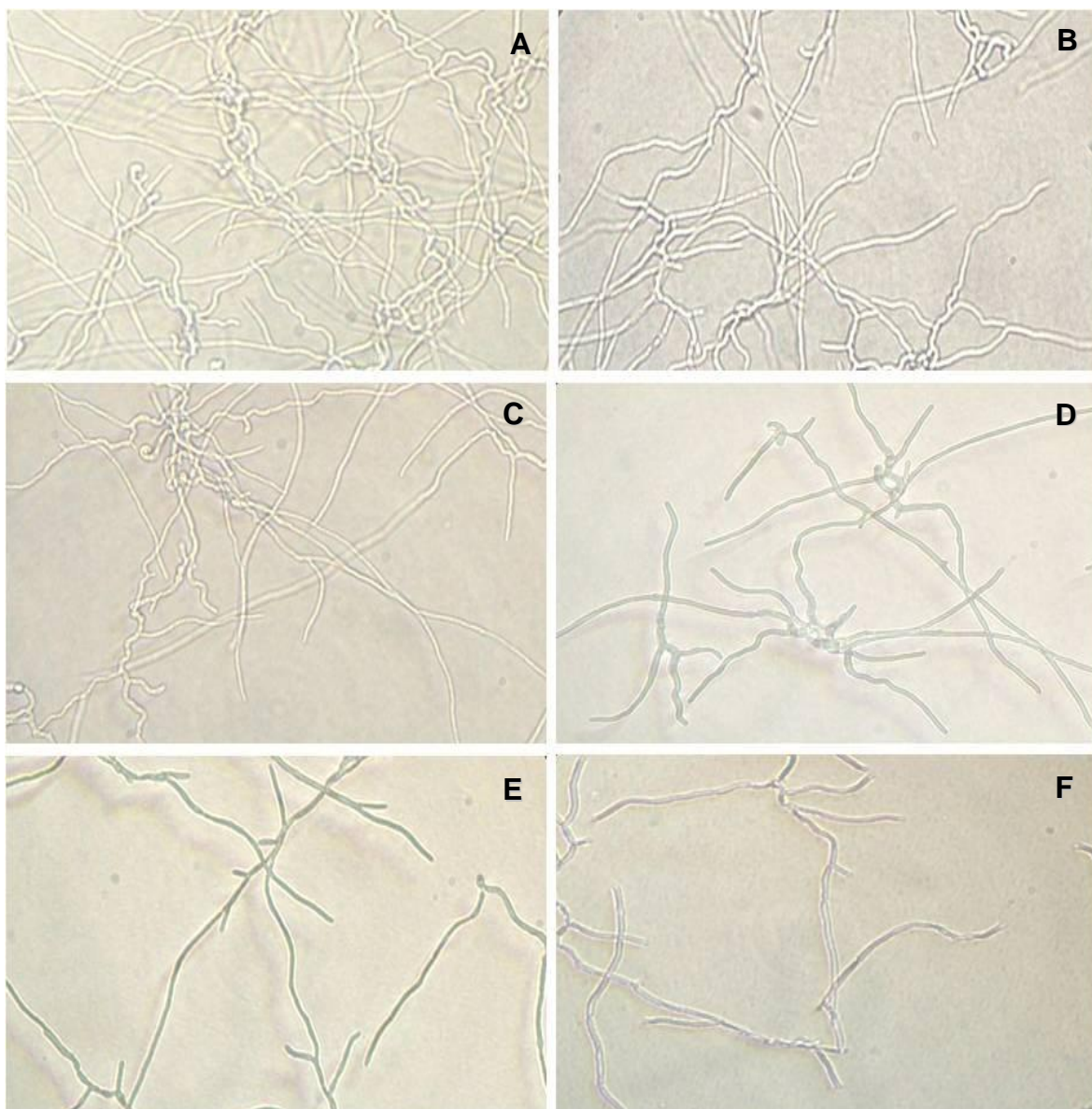


Figura 11: Cultivo de *Metarhizium anisopliae* em meio contendo 0, 0125 % de extrato de levedura. Microscopia óptica de conídios cultivados sobre lamínulas a 28 °C por 12 horas. As concentrações de conídios/mL utilizadas foram (A) $5,0 \cdot 10^4$, (B) $2,5 \cdot 10^4$, (C) $1,0 \cdot 10^4$, (D) $7,5 \cdot 10^3$, (E) $5,0 \cdot 10^3$ e (F) $2,5 \cdot 10^3$. Visualização com aumento de 400X.

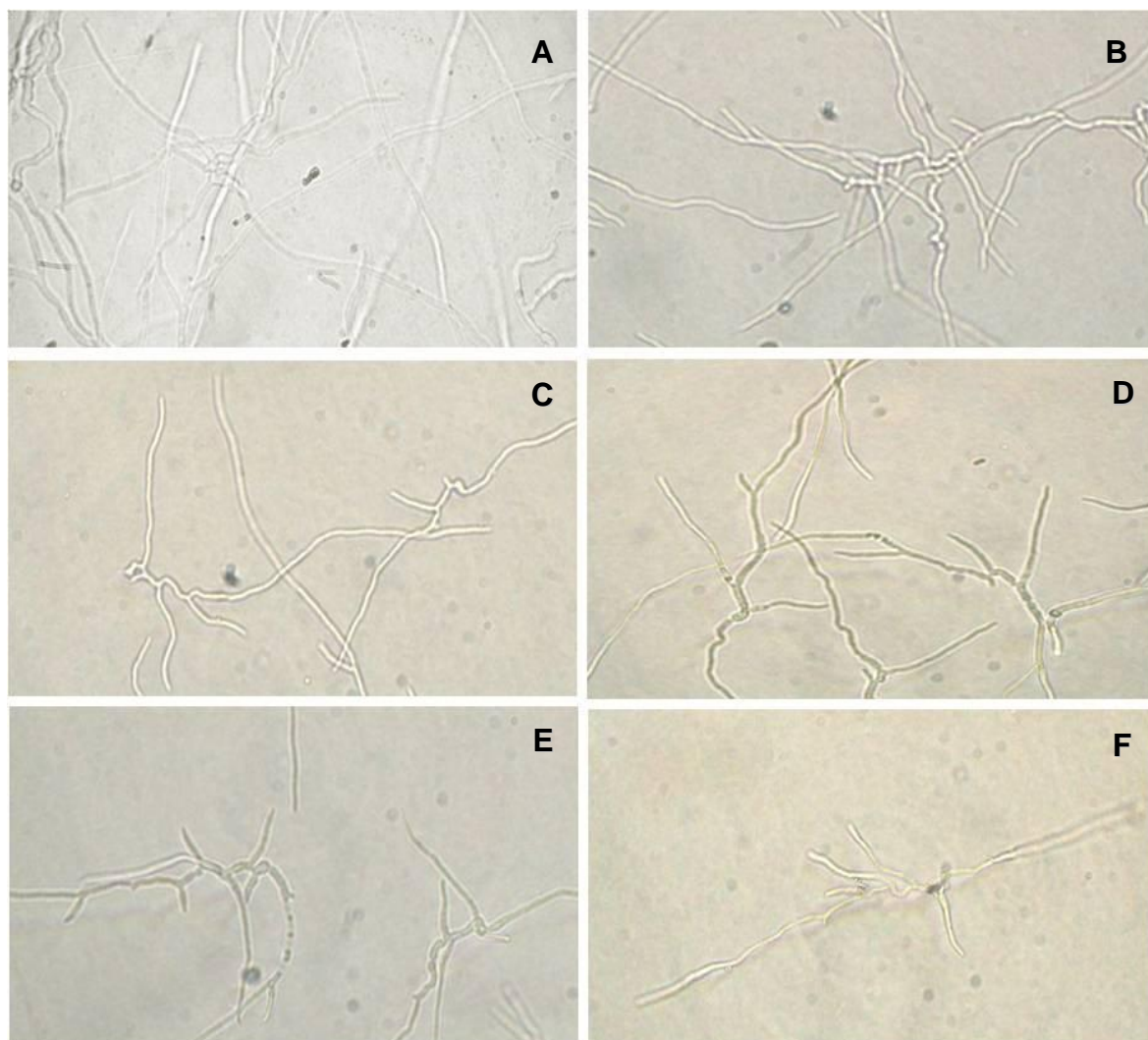


Figura 12: Cultivo de *Metarhizium* em meio contendo 0,0060% de extrato de levedura. Microscopia óptica de conídios cultivados sobre lamínulas a 28 °C por 12 horas. As concentrações de conídios/mL utilizadas foram (A) $5,0 \cdot 10^4$, (B) $2,5 \cdot 10^4$, (C) $1,0 \cdot 10^4$, (D) $7,5 \cdot 10^3$, (E) $5,0 \cdot 10^3$ e (F) $2,5 \cdot 10^3$. Visualização com aumento de 400X.

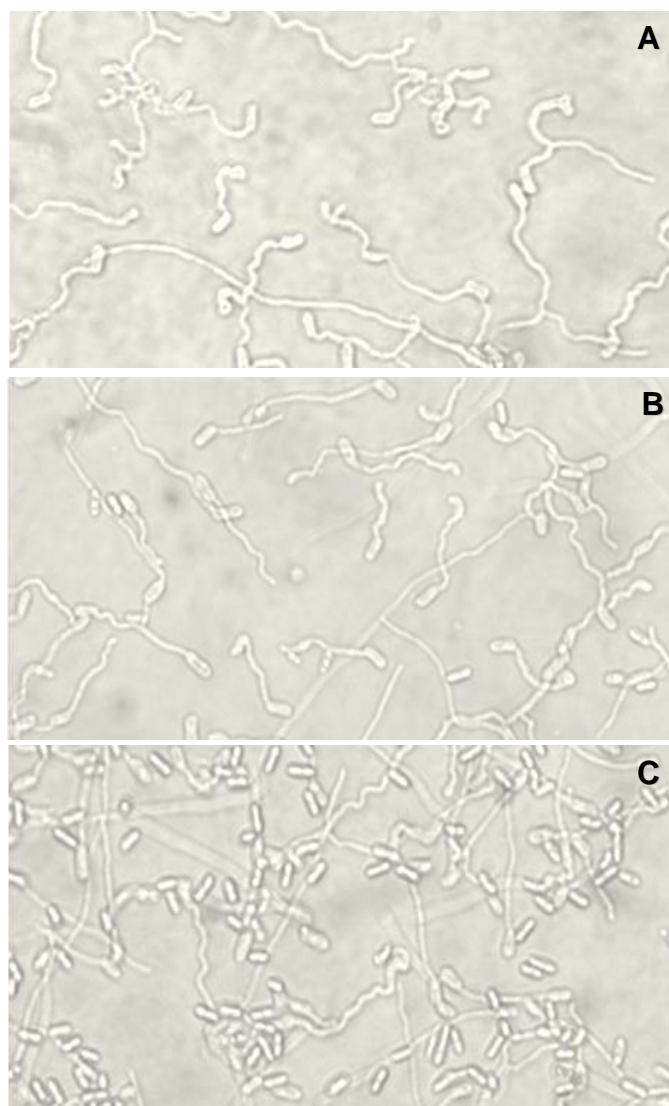


Figura 13: Cultivo de *Metarhizium anisopliae* em meio contendo 0,0040 % de extrato de levedura. Microscopia óptica de conídios cultivados sobre lamínulas a 28 °C por 12 horas. As concentrações de conídios/mL utilizadas foram (A) $5,0 \cdot 10^5$, (B) $1,0 \cdot 10^6$ e (C) $5,0 \cdot 10^6$. Visualização com aumento de 400X.

A concentração de $5,0 \cdot 10^5$ conídios/ mL foi selecionada para avaliação dos efeitos da concentração de extrato de levedura e do tempo de cultivo na diferenciação de apressório. Os cultivos realizados com meio contendo 0,0125% de extrato de levedura apresentaram um aumento no desenvolvimento tanto das hifas que formavam apressório quanto das hifas que não formavam, dificultando a contagem. Portanto essa concentração foi considerada inadequada.

A redução da concentração de extrato de levedura aumentou gradativamente o número de apressórios diferenciados (Figura 14). A concentração de extrato de levedura determinada como a mais eficiente na indução da formação de apressório foi a de 0,0040%. Nessa concentração de extrato de levedura (0,0040%), a indução de apressório foi aumentada em 10% (de 80 para 90%) quando o tempo de cultivo passou de 12 para 16 horas.

Sumarizando nossos resultados, as melhores condições para a indução da diferenciação de apressório foram 0,0040% de extrato de levedura e concentrações de conídios entre $5,0 \cdot 10^5$ e $1,0 \cdot 10^6$ por um período de 16 horas. Os dados numéricos dos ensaios de indução da diferenciação de apressório podem ser visualizados na Tabela 5 e as imagens de microscopia da padronização de apressório na Figura 15.

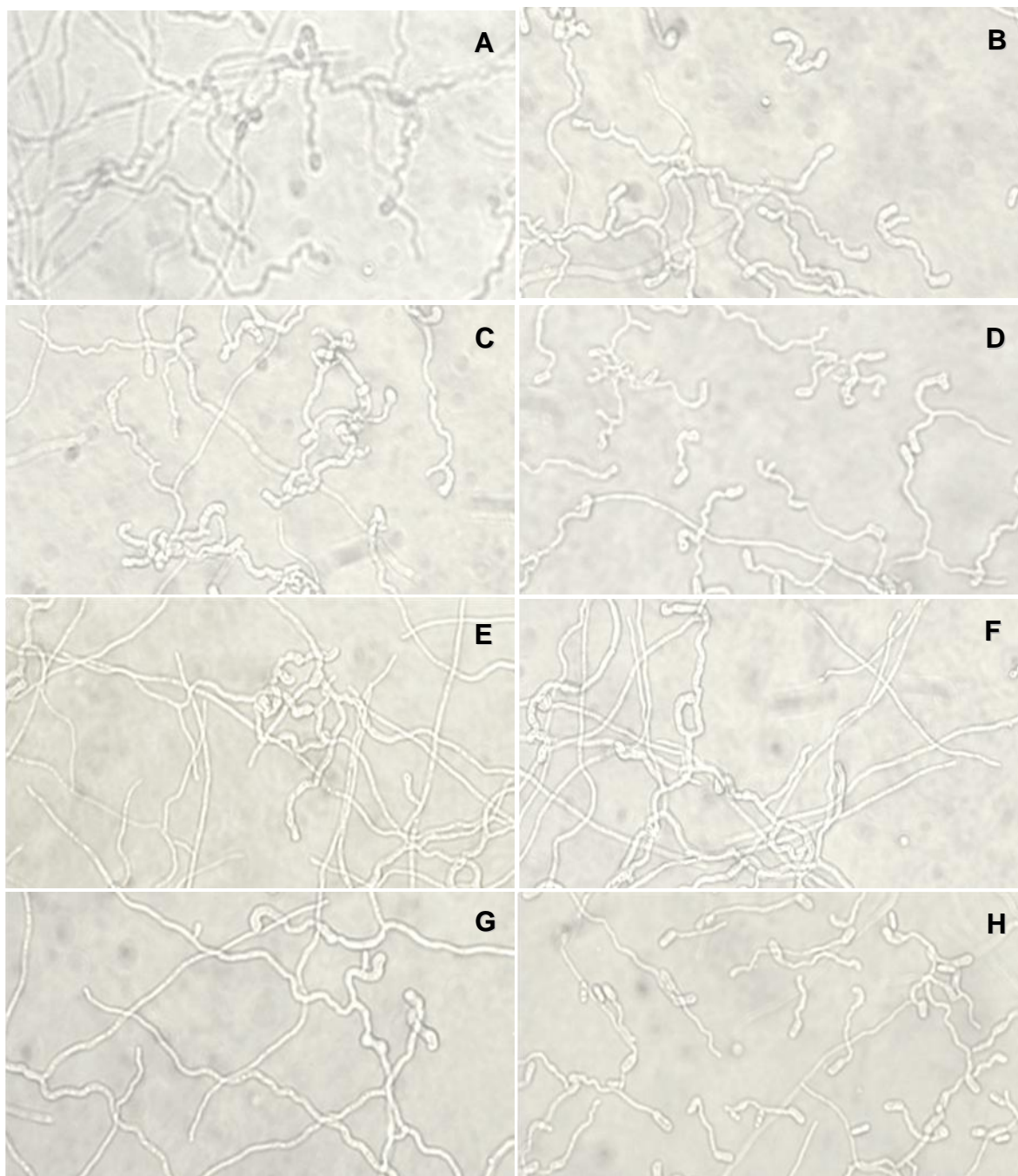


Figura 14: Indução da formação de aseptório de *Metarhizium anisopliae* cultivado por 12 e 16 horas. Microscopia óptica de conídios em uma concentração de $5,0 \cdot 10^5$ conídios/mL, cultivados sobre lamínulas de vidro a 28 °C por 12 horas em meios contendo as seguintes concentrações de extrato de levedura: (A) 0,0125%, (B) 0,0080%, (C) 0,0060% e (D) 0,0040% ou por 16 horas às mesmas concentrações de extrato de levedura (E) 0,0125%, (F) 0,0080%, (G) 0,0060% e (H) 0,0040%). Visualização com aumento de 400X.

Tabela 5: Efeitos da concentração de conídios, extrato de levedura e tempo de incubação na diferenciação de apressório

Concentração de conídeos/ mL	Extrato de levedura (%)	Tempo de incubação (horas)	Diferenciação de apressório (%)
1,0.10 ³	0,0125	12	0
1,0.10 ³	0,0060	12	0
1,5.10 ³	0,0125	12	0
1,5.10 ³	0,0060	12	0
2,5.10 ³	0,0125	12	0
2,5.10 ³	0,0060	12	0
5,0.10 ³	0,0125	12	0
5,0.10 ³	0,0060	12	0
7,5.10 ³	0,0125	12	0
7,5.10 ³	0,0060	12	0
1,0.10 ⁴	0,0125	12	*
1,0.10 ⁴	0,0060	12	*
1,5.10 ⁴	0,0125	12	*
1,5.10 ⁴	0,0060	12	*
2,5.10 ⁴	0,0125	12	*
2,5.10 ⁴	0,0060	12	*
5,0.10 ⁴	0,0125	12	*
5,0.10 ⁴	0,0060	12	33
1,0.10 ⁵	0,0125	12	*
1,0.10 ⁵	0,0080	12	*
1,0.10 ⁵	0,0060	12	*
1,0.10 ⁵	0,0040	12	30
5,0.10 ⁵	0,0125	12	48
5,0.10 ⁵	0,0080	12	72
5,0.10 ⁵	0,0060	12	79
5,0.10 ⁵	0,0040	12	80
5,0.10 ⁵	0,0040	16	90
1,0.10 ⁶	0,0040	16	90
5,0.10 ⁶	0,0040	16	20

*Germinação excessiva impossibilitando a contagem do número de apressório

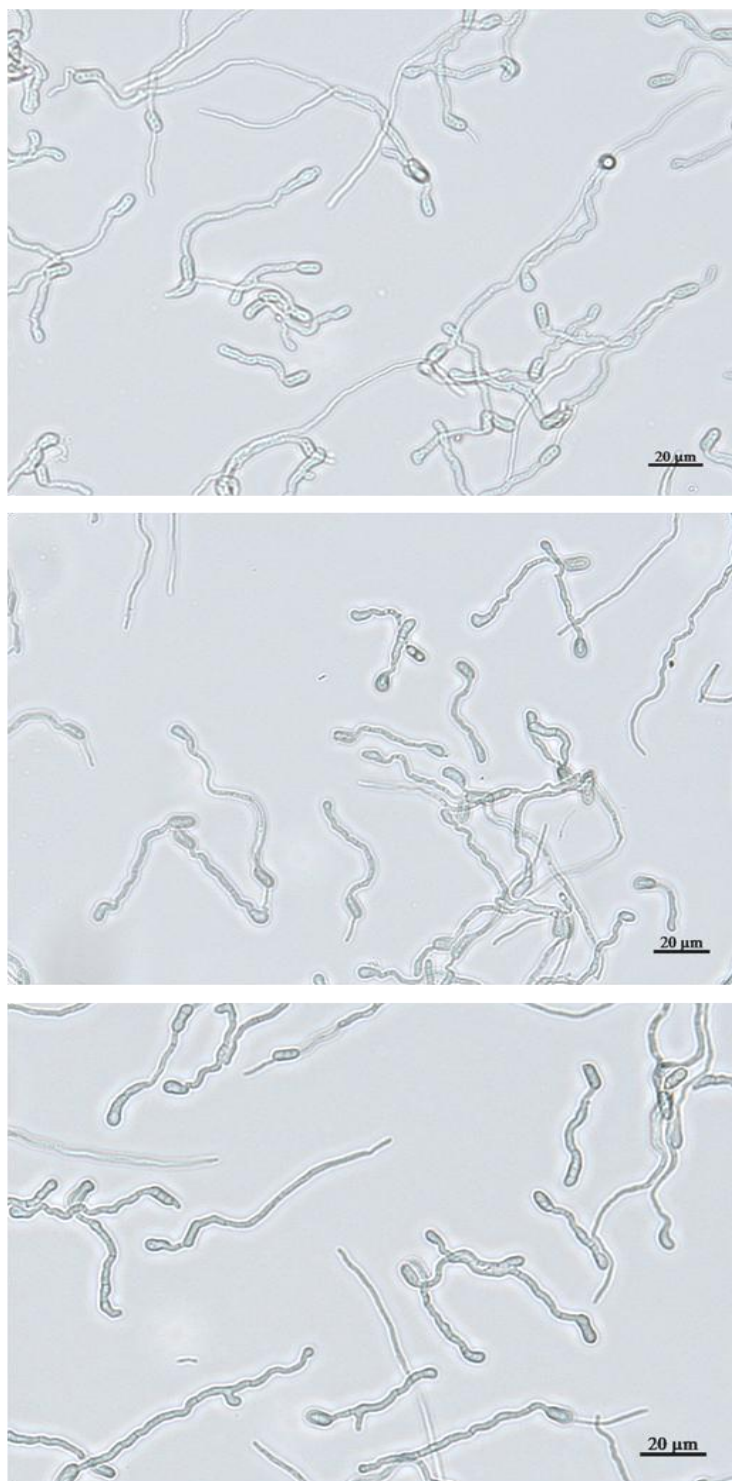


Figura 15: Diferenciação de apressório de *Metarhizium anisopliae*. Microscopia óptica de conídios ($5 \cdot 10^5$ conídios/mL) cultivados sobre lamínulas em meio contendo 0,0040% de extrato de levedura a 28 °C por 16 horas. Visualização de três campos com aumento de 630X.

5.3. Construção do vetor pPZP:*bar: emp1* para a inativação do gene *emp1* em *Metarhizium anisopliae*

Visando identificar a função do *gene emp1* em *M. anisopliae*, iniciamos os experimentos para construção de uma linhagem com este gene inativado. Para tal, foram efetuados experimento de transformação de *M. anisopliae* mediado por *A. tumefaciens* com os plasmídeo pPZP: *bar: emp1* . Este plasmídeo é oriundo da inserção das sequências da porção 5' e a porção 3' do gene *emp1* flanqueando cassete *bar* clonado em pUC18 e posterior clonagem da construção *bar: emp1* no vetor pPZP, dando origem ao vetor pPZP: *bar: emp1*. O vetor pPZP: *bar: emp1* foi avaliado por digestão com endonucleases de restrição (Figura 16) e então utilizado para a transformação de células quiomiocompetentes de *A. tumefaciens* e posterior co-cultivo com *M. anisopliae*.

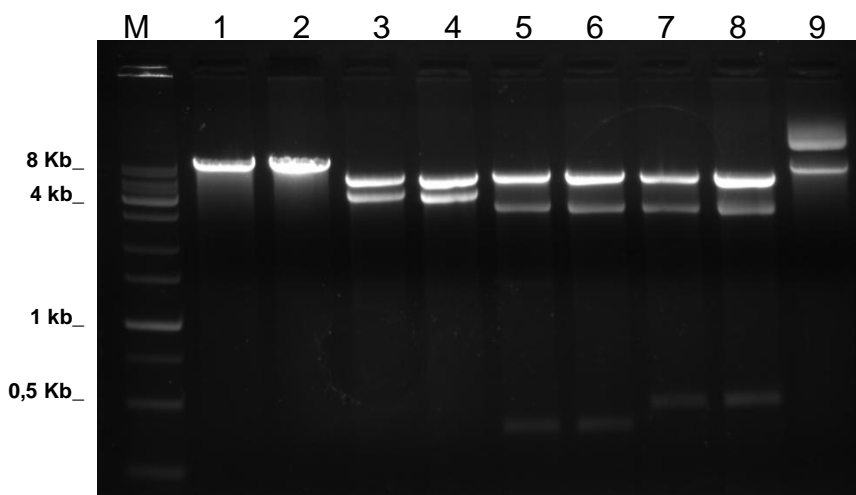


Figura 16: Construção do plasmídeo pPZP: *bar: emp1*. Marcador de peso molecular de DNA (M); DNA plasmidial de pPZP: *bar: emp1* digerido com EcoRI (1) e (2); DNA plasmidial digerido com EcoRI e HindIII (3) e (4); DNA plasmidial digerido com EcoRI e PstII (5) e (6); DNA plasmidial digerido com PstI e HindIII (7) e (8) e vetor íntegro (9).

Após a agro-transformação, 200 colônias de *M. anisopliae* foram recuperadas de 10 membranas de transformação depositadas em meio sólido MC com adição de 250 µg de glifosinato de amônio. Aproximadamente 180 colônias foram capazes de germinar em meio contendo glifosinato de amônio após o terceiro repique. Algumas destas colônias foram selecionadas para verificação da integração do cassete *bar: emp1* no genoma de *M. anisopliae*. Para isso, o DNA dos transformantes foi extraído e analisado através de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos BarF e BarR que amplificam 500 do gene *bar*. A avaliação de 16 desses transformantes revelou que 10 (62,5%) eram positivos para a amplificação de 500 pb do gene *bar* utilizando-se os oligonucleotídeos BarF e BarR (Figura 17).

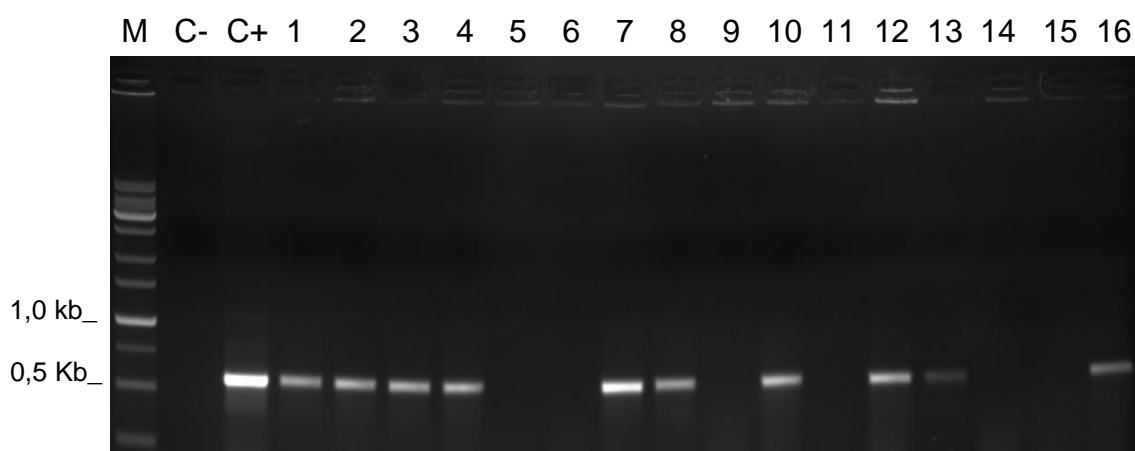


Figura 17: Análise de transformantes de *Metarhizium anisopliae* para a confirmação da presença do cassete *bar: emp1*. Amplificação de uma região de 500 pb do gene *bar*. M (marcador de tamanho molecular); C- (controle negativo); C+ (controle positivo); 1-16 (prováveis transformantes avaliados).

6. DISCUSSÃO

O processo de infecção de *M. anisopliae* é o melhor caracterizado entre os fungos entomopatogênicos e vários estudos estão sendo realizados na tentativa de desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nas interações parasita-hospedeiro. Visando ampliar os conhecimentos sobre as estratégias moleculares utilizadas pelo fungo para infectar seus hospedeiros, o gene *emp1* de *M. anisopliae*, que em *M. grisea* está envolvido com a formação de apressório, teve sua sequência isolada através de Genome Walking e caracterizada.

A metodologia de Genome Walking tem sido utilizada para o isolamento de sequências com alto peso molecular (superiores a 10 Kb) (RISHI *et al.*, 2004), no entanto, neste trabalho, ela foi eficiente para o isolamento um fragmento de 1,1Kb. Análises de hibridização do gene *emp1* com o DNA genômico de *M. anisopliae* revelaram que este gene está presente como cópia única no genoma. A análise comparativa da sequência do gene *emp1* com a sequência de cDNA parcial depositada no GenBank (AJ273721) permitiu determinar a presença de dois íntrons (60 e 65 pares de bases) que apresentaram as sequências canônicas tipicamente encontradas em fungos (BALLANCE, 1989). As sequências de *M. grisea* (Ahn *et al.*, 2003) e *F. oxysporum* (SCHOFFELMEER *et al.*, 2001) apresentam apenas um *íntron*. A ORF completa do gene *emp1* de *M. anisopliae* apresenta 678 pb e codifica uma provável proteína de 226 pb que apresenta as seguintes características que a classificam como uma proteína de matriz extracelular ancorada por GPI: i) peptídeo sinal para secreção na porção N-terminal (NIELSEN *et al.*, 1997); ii) sítio de ancoramento de GPI na porção C-terminal; fundamental para a incorporação da proteína de matriz extracelular de *F.*

oxysporum na parede celular (SCHOFFELMEER *et al.*, 2001) (iii) alta porcentagem (29,7%) de resíduos de serina e treonina; uma característica comum a proteínas de matriz extracelular em leveduras (CARO *et al.*, 1997) (iv) provável sítio de N-glicosilação. O sítio de ancoramento de GPI na porção C-terminal da proteína Emp1 predita, é composto por um motivo de três peptídeos consistindo de aspargina (N – ω), alanina (A – $\omega + 1$) e glicina (G - $\omega + 2$). Esse motivo está de acordo com a regra ω , $\omega + 1$ e $\omega + 2$ definida por Gerber *et al.* (1992).

Sabe-se que a formação de apressório é uma etapa do desenvolvimento do fungo que envolve uma estreita interação patógeno – hospedeiro e que depende da capacidade do fungo de reconhecer seu hospedeiro e/ou alguns estímulos de superfície. Atualmente, com os avanços da biologia molecular e biologia celular de fungos filamentosos, vários estudos têm revelado os estímulos ambientais, as vias de sinalização e os determinantes genéticos envolvidos na diferenciação de apressório, principalmente em fungos fitopatogênicos (DEAN, 1997). No entanto, pouco se sabe sobre a diferenciação de apressório em fungos entomopatogênicos.

O fungo *M. anisopliae* é um dos fungos entomopatogênicos melhor caracterizados e tem sido considerado um importante modelo para o estudo de biologia molecular, regulação gênica, desenvolvimento e interação patógeno-hospedeiro. A diferenciação de apressório desempenha um papel importante no processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros e é um processo normalmente influenciado pela disponibilidade de nutrientes no meio e a natureza da superfície com a qual o fungo está em contato. Entender essa etapa de desenvolvimento pode desvendar importantes fatores determinantes de virulência

de *M. anisopliae*. Leger *et al.* (1989) padronizaram a indução da diferenciação de apressório *in vitro* em *M. anisopliae*, e descreveram que a ocorrência deste processo dependente de estímulos de superfície como rigidez e hidrofobicidade e presença obrigatória de fontes externas de nutrientes. Os mesmos estímulos são capazes de induzir a diferenciação em *Magnaporthe grisea*, no entanto, algumas linhagens desse fungo são capazes de se diferenciarem sem fonte alguma de nutrientes, necessitando somente da presença de água.

Depois de verificar que as condições otimizadas por St Leger *et al.* (1989) não apresentaram os mesmos resultados quando reproduzidas com a linhagem (E6), utilizada por nosso grupo de pesquisa, iniciamos uma série de testes visando determinar inicialmente condições para a indução da formação de apressório em *M. anisopliae* linhagem E6 que fossem reprodutíveis, estimulassem a diferenciação de um mínimo de 70% de apressórios por lamínula e permitissem a contagem do número de apressório por campo. Para tal, utilizamos como fonte de nutrientes baixas concentrações de extrato de levedura (entre 0,0125% e 0,0040%). A melhor concentração de extrato de levedura determinada foi a de 0,0040%. Meios contendo concentrações superiores a 0,0080% de extrato de levedura induziram o aumento do crescimento vegetativo impossibilitando a contagem do número de apressórios.

Condições nutricionais normalmente influenciam a esporulação e virulência de fungos patógenos de insetos. Shah *et al.* (2005) avaliaram a virulência de conídios de *M. anisopliae* produzidos em insetos e em outros 4 diferentes meios, dentre eles um contendo extrato de levedura e verificaram que, exceto pelo cultivo realizado em insetos, os conídios cultivados em meio com extrato de levedura

apresentavam-se mais virulentos. Além disso, postularam que em condições de privação de nutrientes, *M. anisopliae* tende a ter sua virulência aumentada, o que deve ocorrer por um aumento na produção da protease Pr1, importante fator de virulência, em condições de estresse nutricional. Adicionalmente, Rangel *et al.* (2008) verificaram que durante a privação de nutrientes, ocorre um acúmulo de manitol e trealose, um soluto considerado importante para a formação de turgor presente no apressório responsável pela pressão hidrostática.

Além de fatores nutricionais, a diferenciação de apressório de *M. anisopliae* parece ser um processo também dependente da concentração de conídios. Quando cultivado em condições inferiores a $5,0 \cdot 10^4$ pode-observar o aumento da germinação e formação de apressório indetectável. Na concentração de $5 \cdot 10^6$ tanto o número de hifas germinadas quanto a diferenciação de apressório sofreram um decréscimo.

Atualmente, diversos estudos têm revelado que alterações morfológicas em fungos filamentosos também são controladas por moléculas auto-regulatórias através de mecanismos de *quorum sensing* (CHEN & FINK, 2006). À exemplo disso, *Uromyces phaseoli* produz um auto-inibidor da germinação (metil 3,4-dimetoxicinamto) que é efetivo mesmo em concentrações nanomolares e que necessita ser removido por água para que ocorra a germinação dos uredosporos. Esse mecanismo auxiliaria na redução da auto-competição dentro de uma mesma população por bloquear a germinação até que o esporo seja disperso. Em culturas de *Glomerella cingulata*, uma molécula de identidade química não identificada, reduz a formação de micélio e aumenta a formação de conídios em densidades celulares superiores a 10^6 esporos/mL. Em *Magnaporthe grisea*,

Hedge & Kolattukudy (1997) identificaram auto-inibidores da diferenciação de apressório, de natureza lipofílica, que atuam de maneira dose dependente e que em populações densas (superiores a $1,0 \cdot 10^6$ conídios/mL) atingem concentrações necessárias para o desempenho de sua atividade. O efeito desse auto-inibidor é revertido pela presença de lipídeos da cutícula do arroz.

A presença de auto-inibidores poderia explicar a redução da germinação de formação de apressório em *M. anisopliae* encontrados nesse trabalho quando cultivados em concentrações superiores a $5,0 \cdot 10^6$ conídios/mL. Entretanto, não é suficiente para justificar a redução na diferenciação de apressório em condições de cultivo com concentrações inferiores a $5,0 \cdot 10^4$ conídios/mL.

Após o isolamento e caracterização do gene *emp1* e a padronização dos ensaios de indução de apressório, foram realizados experimentos de transformação de *M. anisopliae*, mediada *A. tumefaciens*, com o vetor pPZP:*bar:emp1*, visando construir linhagens com o gene *emp1* inativado.

A transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) tem sido utilizada em um grande número de fungos como uma importante ferramenta para análise funcional de genomas. Uma das maneiras utilizadas para atribuir funções de genes através de ATMT é a inativação gênica por recombinação homóloga. Essa estratégia se baseia 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).

Em 2007, Staats *et al.* descreveram a padronização da inativação gênica mediada por *A. tumefaciens* demonstrando-a como uma metodologia eficiente para a obtenção de mutantes nulos em *M. anisopliae*, com obtenção de

recombinação homóloga em uma frequência de 20%. Em nosso trabalho, pode-se observar uma frequência de transformantes superior a 60%. No entanto, o método utilizado para seleção não foi capaz de diferenciar os transformantes com recombinação homóloga ou ectópica.

7. CONCLUSÕES

A metodologia de *Genome Walking* mostrou-se eficaz para o isolamento da sequência do gene *emp1* de *Metarhizium anisopliae*.

A sequência da proteína predita de *emp1* de *M. anisopliae* apresenta características como: peptídeo sinal para secreção na porção N-terminal, sítio de ancoramento de GPI na porção C-terminal, alta porcentagem (29,7%) de resíduos de serina e treonina, provável sítio de N-glicosilação; que a classificam como uma provável proteína de matriz extracelular, além de apresentar homologia de sequência com outras proteínas de matriz extracelular.

Foi possível induzir a diferenciação de apressório *in vitro* do fungo *M. anisopliae* linhagem E6.

As concentrações de esporos e de extrato de levedura são limitantes para a indução da diferenciação da apressório, sendo 0,0040% de extrato de levedura e $5,0 \cdot 10^5$ ou $1,0 \cdot 10^6$ esporos/ mL as melhores condições indutoras.

A metodologia de transformação de *M. anisopliae* mediata por *Agrobacterium tumefaciens* foi eficiente para gerar transformantes positivos para a marca de seleção, o gene *bar*, com estabilidade demonstrada através três repiques consecutivos em meio seletivo.

8. PERSPECTIVAS

Seleção de transformantes com inserção homóloga do cassete *bar: emp1* para posterior análise da influência de *emp1* na formação de apressório em *M. anisopliae*, incluindo ensaios de análise de turgor *in vitro* e bioensaios.

Purificação da proteína Emp1 e análise da localização celular de Emp1 através de imuno localização.

9. REFERENCIAS

- AHN, N.; KIM, S.; CHOI, W.; LEE, Y. H. Extracellular matrix protein gene, *emp1*, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cells*, 17:166-173, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid. Res.*, 25 :3389–3402, 1997.
- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz; 1998.
- ARRUDA, W. Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
- ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.*, 37:231-244, 2005.
- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; SILVA, D. M.; GIMÉNEZ, M. P.; AZEVEDO, J. L. & SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.*, 100(12): 1468-1472, 1996.
- BAE, C. Y.; KIM, S.; CHOI, W. B.; LEE, Y. H. Involvement of extracellular matrix and integrin-like proteins on conidial adhesion and appressorium differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 1198-1203, 2007.
- BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S. E.; ST. LEGER, R. J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324 : 159–169, 2003.
- BALANCE, D. J. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast*, 2:229-236, 1986.
- BARD, M.; BRUNER, D. A.; PIERSON, C. A.; LEES, N. D.; BIERMANN, B.; FRYE, L.; KOEGEL, C.; BARBUCH, R. Cloning and characterization of *erg25*, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding c-4 sterol methyl oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:186-190, 1996.
- BIDOCHKA, M. J.; ST LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomol. Soc. Can.*, 171:213-224, 1997.
- BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can. J. Bot.*, 68:329–342, 1990.
- BUTT, T. M. J.; MAGAN, N. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential CABI Publishing; 2001.
- CARACUEL-RIOS, Z.; TALBOT N. J. Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10:339-345, 2007.
- CARO, L. H.; TETTELIN, H.; VOSSEN, J. H.; RAM A. F.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored

- plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13:1477-1489, 1997.
- CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.*, 20:1150-1161, 2006.
- CHOI, J., KIM, Y.; LEE, Y. H. 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, 2009.
- CHOI, W.; DEAN, R. A. The adenylate cyclase gene *mac1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell*, 9:1973-1983, 1997.
- CLARKSON, J. M.; CHARNLEY A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.*, 4:197-203, 1996.
- CORREA, A. J.; STAPLES, R. C.; HOCH, H. C. Inhibition of thigmostimulated cell differentiation with RGD-peptides in *Uromyces* germlings. *Protoplasma*, 194: 91-104, 1996.
- COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol. Res.*, 105:259-264, 2001.
- DA SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; DA COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase *chit30* from *metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol.*, 156:382-392, 2005.
- DE JONG, J. C.; MCCORMACK, B. J.; SMIRNOFF, N.; TALBOT, N. J. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, 389: 44-245, 1997.
- DEAN, R. A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35:211-234, 1997.
- DEZWAAN, T. M.; CARROLL, A.M.; VALENT, B.; SWEIGARD, J. A. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell.*, 11:2013-2030, 1999.
- DICKMAN, M. B.; HA, Y. S.; YANG, Z.; ADAMS, B.; HUANG, C. A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16: 411-421, 2003.
- DONG, C.; ZHANG, J.; HUANG, H.; CHEN, W.; HU, Y. Pathogenicity of a new china variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. *Microbiol. Res.* 164:27-35, 2009.
- DRIVER, F; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of *rdna* sequence data. *Mycol. Res.*, 104:134-150, 2000.
- FANG, W.; PEI, Y.; BIDOCHKA, M. J. 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. *Microbiol.*, 153:1017-1025, 2007.
- FANG, W.; PAVA-RIPOLL, M.; WANG, S.; ST LEGER, R. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet. Biol.*, 46:277-285, 2009.

- FOSTER, A. J.; JENKINSON, J. M.; TALBOT, N. J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J.*, 22:225-235, 2003.
- FRAZZON, A. P.; VAZ JUNIOR, I. S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of metarhizium anisopliae isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 94:117-125, 2003.
- FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G. & ST LEGER, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, 149:239–247, 2003.
- GERBER, L. D.; KODUKULA, K.; UDENFRIEND, S. 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. *J. Biol. Chem.*, 267:12168-12173, 1992.
- GÖKÇE, A.; KUBILAY, E. R. Pathogenicity of *Paecilomyces spp.* To the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. *Turk. J. Agric. For.*, 29:331-339, 2005.
- GUO, H.; XIONG, J. A specific and versatile genome walking technique. *Gene*, 381:18-23, 2006.
- HATZIPAPAS, P.; KALOSAKA, K.; DARA, A.; CHRISTIAS, C. Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycol. Res.*, 11:1349-1359, 2002.
- HEGDE, Y.; KOLATTUKUDY, P. E. Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 51:75-84, 1997.
- HORNBOSTEL, V. L.; ZHIOUA, E.; BENJAMIN, M. A.; GINSBERG, H. S.; OSTFELDT, R. S. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Exp. Appl. Acarol.* 35:301-316, 2005.
- HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A.; ROACH, D. H.; MONEY, N. P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:11281-11284, 1991.
- JENTOFT, N. Why are proteins o-glycosylated? *Trends Biochem. Sci.*, 15:291-294, 1990.
- JUAREZ, M. P.; CRESPO, R.; FERNANDEZ, G. C.; LECUONA, R.; CAFFERATA, L. F. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *J. Invertebr. Pathol.*, 76:198-207, 2000.
- KAAYA, G. P.; MUNYINYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina spp.*) at developmental sites. *J. Invertebr. Pathol.*, 66:237-241, 1995.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 67:15-20, 1996.
- KANZOK, S. M.; JACOBS-LORENA, M. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *Trends Parasitol.*, 22:49-51, 2006.

- KIM, Y. K.; LI, D.; KOLATTUKUDY, P. E. Induction of ca^{2+} -calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *J. Bacteriol.*, 180:5144-5150, 1998.
- KOJIMA, K.; KIKUCHI, T.; TAKANO, Y.; OSHIRO, E.; OKUNO, T. The mitogen-activated protein kinase gene *maf1* is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 15:1268-1276, 2002.
- LATGE, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 66:279-290, 2007.
- LAZZARINI, G. M.; ROCHA, L. F.; LUZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycol. Res.* 110:485-492, 2006.
- LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 97:40-49, 2008.
- LEV, S.; SHARON, A.; HADAR, R.; MA, H.; HORWITZ, B. A. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:13542-13547, 1999.
- LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grups and its Anarmorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78: 178-182, 2001.
- LU, C. F.; MONTIJN, R. C.; BROWN, J. L.; KLIS, F.; KURJAN, J.; BUSSEY, H.; LIPKE, P. N. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell. Biol.*, 128:333-340, 1995.
- LUZ, C, TAI, M. H.; SANTOS, A.H.; SILVA, H. H. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103:214-215, 2008.
- LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93:839-846, 1998.
- MARANGA, R. O.; KAAYA, G. P.; MUEKE, J. M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. *Mycopathol.* 159:527-532, 2005.
- MARKOWITZ, V. M.; SZETO, E.; PALANIAPPAN, K.; GRECHKIN, Y.; CHU, K.; CHEN, I. M.; DUBCHAK, I.; ANDERSON, I.; LYKIDIS, A.; MAVROMATIS, K. The integrated microbial genomes (img) system in 2007: Data content and analysis tool extensions. *Nucleic. Acids. Res.* 36:D528-533, 2008.
- MITCHELL, T.K; DEAN, R. A. The camp-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 7:1869-1878, 1995.
- NICHOLAS, K.; NICHOLAS, H. B. J. Genedoc: a tool for editing and annotation multiple sequence alignments. *Distributed by authors* 1997.

- NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein. Eng.*, 10: 1-6, 1997.
- NISHIMURA, M.; PARK, G.; XU, J. R. The g-beta subunit mgb1 is involved in regulating multiple steps of infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Microbiol.*, 50:231-243, 2003.
- OH, Y.; DONOFRIO, N.; PAN, H.; COUGHLAN S.; BROWN, D. E.; MENG, S.; MITCHELL, T.; DEAN, R. A. Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biol.*, 9:R85, 2008.
- PARK, G.; XUE, C.; ZHAO, X.; KIM, Y.; ORBACH, M.; XU, J. R. Multiple upstream signals converge on the adaptor protein mst50 in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.*, 18:2822-2835, 2006.
- PAUL, M. J.; PRIMAVESI, L. F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 59:417-441, 2008.
- PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUAREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 146:124-137, 2007.
- PIRES, L. M.; MARQUES, E. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A.; ALVES, L. C.; ALVES, E. S. Ultrastructure of tuta absoluta parasitized eggs and the reproductive potential of females after parasitism by *Metarhizium anisopliae*. *Micron*, 40:255-261, 2009.
- RANGEL D. E.; ANDERSON A. J.; ROBERTS, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and uv-b radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol. Res.*, 112:1362-1372, 2008.
- RISHI, A. S.; NELSON, N. D.; GOYAL, A. Genome walking of large fragments: an improved method. *J. Biotechnol.*, 111:9-15, 2004.
- RUIZ-ROLDAN, M. C.; MAIER, F. J.; SCHAFER, W. Ptk1, a mitogen-activated-protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14:116-125, 2001.
- SCHOFFELMEER, E. A.; VOSSEN, J. H.; VAN DOORN, A. A.; CORNELISSEN, B. J.; HARING M. A. Fem1, a *Fusarium oxysporum* glycoprotein that is covalently linked to the cell wall matrix and is conserved in filamentous fungi. *Mol. Genet. Genomics*, 265:143-152, 2001.
- SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B.G.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J. Invertebr. Pathol.* 91:43-49, 2006.
- SCHOLTE, E. J.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop.*, 102:151-158, 2007.
- SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryot. Cell*, 5:1941-1949, 2006.
- SHAH, F. A.; WANG, C. S.; BUTT, T. M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 251:259-266, 2005.

- SHI, W. B.; ZHANG, L. L.; FENG, M. G. Fields trials of four formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for control of cotton spider mites (acari: Tetranychidae) in the tarim basin of china. *Biol. Control*, 45:48-55, 2008.
- SKAMNIOTI, P.; GURR, S. J. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell*, 19:2674-2689, 2007.
- SOSA-GMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. *J. Invertebr. Pathol.*, 71:115-120, 1998.
- ST LEGER, R.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:6349-6354, 1996.
- ST LEGER, R. J.; BUTT, T.; GOETTEL, M. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Production *in vitro* by the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.*, 13 274-288, 1989.
- ST LEGER, R.J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J Invertebr. Pathol.*, 98:271-276, 2008.
- STAATS, C. C.; JUNGES, A.; FITARELLI, M.; FURLANETO, M. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76:945-950, 2007.
- TAKANO, Y.; KOMEDA, K.; KOJIMA, K.; OKUNO, T. Proper regulation of cyclic amp-dependent protein kinase is required for growth, conidiation, and appressorium function in the anthracnose fungus *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 14:1149-1157, 2001.
- TALAEI-HASSANLOUI, R.; KHARAZI-PAKDEL, A.; GOETTEL, M. S.; LITTLE, S.; MOZAFFARI, J. Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *J. Invertebr. Pathol.*, 94:102-107, 2007.
- THINES, E.; WEBER, R. W.; TALBOT, N. J. Map kinase and protein kinase a-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 12:1703-1718, 2000.
- TOLEDO, A. V.; DE REMES LENICOV, A. M.; LOPEZ LASTRA, C. C. Pathogenicity of fungal isolates (Ascomycota: Hypocreales) against *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae), and *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of corn diseases. *Mycopathol.*, 163:225-232, 2007.
- UHM, K. A.; KIM, S.; LEE, Y. H. Calcium/calmodulin-dependent signaling for prepenetration development in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathol.* 93:82-87, 2003.
- VENEAULT-FOURREY, C.; BAROOAH, M.; EGAN, M.; WAKLEY, G.; TALBOT, N. J. Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. *Science* 312:580-583, 2006.
- WANG, C.; DUAN, Z.; ST LEGER, R. J. Mos1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot. Cell*, 7:302-309, 2008.

- WANG, C.; ST LEGER, R. J. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryot. Cell*, 4:937-947, 2005.
- WANG, C.; ST LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103:6647-6652, 2006.
- WANG, C.; ST LEGER, R. J. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog mpl1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *J. Biol. Chem.*, 282:21110-21115, 2007;
- WANG, C.; TYPAS, M. A.; BUTT, T. M. Detection and characterisation of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 213:251-255, 2002.
- WANG, Z. Y.; JENKINSON, J. M.; HOLCOMBE, L. J.; SOANES, D. M.; VENAULT-FOURREY, C.; BHAMBRA, G. K.; TALBOT, N. J. The molecular biology of appressorium turgor generation by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biochem. Soc. Trans.*, 33:384-388, 2005.
- WELD, R. J.; PLUMMER, K. M.; CARPENTER, M. A.; RIDGWAY, H. J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res.*, 16:31-44, 2006.
- WILSON, R. A.; TALBOT, N. J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7:185-195, 2009.
- XAVIER-SANTOS, S.; MAGALHÃES, B.; LIMA, E. A. L. A. Differentiation of the entomopathogenic fungus *metarhizium flavoviride* (hyphomycetes) *Rev. de Microbiol.*, 30, 1999.
- XU, J. R. Map kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet. Biol.*, 31:137-152, 2000.
- XU, J. R.; HAMER, J. E. Map kinase and camp signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.*, 10:2696-2706, 1996.
- ZHAO, X.; KIM, Y.; PARK, G.; XU, J. R. A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 17:1317-1329, 2005.
- ZHOU, X. L.; STUMPF, M. A.; HOCH, H. C.; KUNG, C. A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. *Science*, 253:1415-1417, 1991.