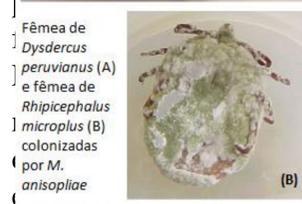


INTRODUÇÃO

A quitina é um dos principais componentes da parede celular de fungos e do exoesqueleto de artrópodes. As quitinases, enzimas que clivam o polímero de quitina liberando subunidades de N-acetilglicosamina, estão presentes em organismos que, ou necessitam remodelar a sua própria quitina ou dissolver a quitina exógena de outros fungos ou animais [1]. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um agente biocontrolador de artrópodes praga e também um modelo para o estudo dessas interações entre patógenos e



Estudos funcionais são necessários para atribuir a função a cada uma dessas quitinases durante o ciclo de vida do fungo. Caracterizar a função da quitinase ChiMaA4 pela construção de mutantes nulos para o gene *chimaA4* elucidada a questão da atuação dessa enzima no processo de infecção.

1) Confirmar a obtenção de mutantes nulos para o gene *chimaA4*

OBJETIVOS

- 2) Construir a linhagem complementada, utilizando um vetor contendo o *cassette* para expressão de *chimaA4* e uma segunda marca de seleção (gene *sur*).
- 3) Analisar o fenótipo dos mutantes e complementados construídos, caracterizando as alterações morfológicas e o processo de germinação, crescimento de hifas, esporulação, formação de apressório e formação de blastosporos.

Previamente, o *cassette* de deleção do gene *chimaA4* foi construído por PCR

METODOLOGIA

obtidos indicou 11 potenciais mutantes nulos para o gene de interesse.

1) Confirmação dos transformantes com deleção do gene *chimaA4* por reação de PCR: os 11 transformantes foram cultivados em Mcc líquido e a extração de DNA micelial foi realizada. Uma nova confirmação pelo método de PCR foi realizada, utilizando oligonucleotídeos que amplificam (1) 460 pb referentes à região interna do gene *chimaA4*, (2) 1880 pb referentes ao gene *bar* e (3) 2880 pb referentes a um fragmento que contém regiões dos dois *cassettes*. Os transformantes que apresentaram sinal de amplificação positivo na reação 3, foram posteriormente confirmados em relação a inserção do gene *bar* na região interna do gene *chimaA4*.

2) Confirmação dos transformantes de pelo método de Southern blot: DNA genômico dos transformantes e que apresentaram sinal de amplificação positivo para a reação 3 e da linhagem selvagem foi digerido com as enzimas de restrição *SacI* e *NcoI*. A sonda obtida por PCR (800 pb) e clivada com enzima *SacI*. Procedimento foram realizados de acordo com protocolo AlkPhos (Amersham).

3) Construção do plasmídeo pPZP::Sur::A4+ para obtenção da linhagem complementada: o gene *chimaA4* foi clonado no vetor pCR2.1TOPO e subclonado em pPZP::SUR a fim de obter pPZP::SUR::A4+. O vetor obtido foi transformado em células de *Escherichia coli* quimiocompetentes e cultivadas em placas com diferentes concentrações. Posteriormente, o DNA plasmidial foi extraído e a inserção foi confirmada por múltiplas clivagens com enzimas de restrição.

RESULTADOS

1) Confirmação da construção de 4 mutantes nulos para o gene *chimaA4*: Dos 11 transformantes analisados por PCR, 4 (T1, T2, T3 e T4) apresentaram sinal de amplificação positivo para a presença do *cassette* de deleção do gene *chimaA4* e do *cassette* de expressão do gene *bar* (marca de seleção).

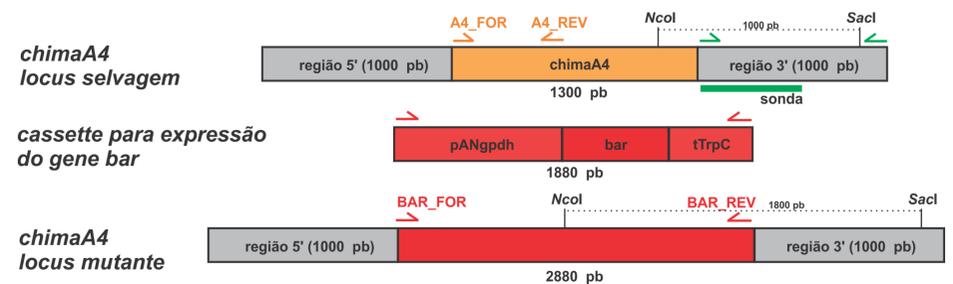


Figura 2. Representação esquemática do locus selvagem e mutante do gene *chimaA4*. Os primers indicados na figura foram utilizados para confirmar a presença do *cassette* de deleção do gene *chimaA4* (em laranja) e do *cassette* de expressão do gene *bar* (em vermelho). As enzimas *NcoI* e *SacI* e a sonda (em verde) foram utilizadas no *Southern blot*.

2) Confirmação dos mutantes por Southern blot: A análise de *Southern blot* confirmou três transformantes positivos (T2, T3 e T4) para deleção do gene *chimaA4*.

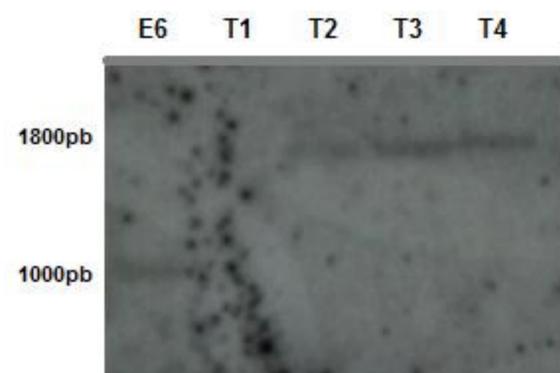


Figura 3. Confirmação da construção de mutantes nulos por *Southern blot*. *M. anisopliae* E6 foi utilizada como linhagem selvagem controle e apresenta banda com tamanho esperado de 1000 pb. Mutantes nulos apresentam banda esperada de 1800 pb. Os sítios para as enzimas de restrição utilizadas (*NcoI* e *SacI*) e a região da sonda estão demonstrados na Figura 2.

3) Construção de vetor para obtenção da linhagem complementada: o gene *chimaA4* contendo suas regiões reguladoras endógenas (3300 pb) foi clonado no vetor pCR2.1TOPO e será subclonado no vetor pPZP::SUR para obtenção de pPZP::SUR::A4+, o qual apresentará uma segunda marca de resistência (resistência a clorimuron-etil).

PERSPECTIVAS

Após confirmações, será efetuada a agrotransformação da linhagem $\Delta A4$ com o plasmídeo pPZP::SUR::A4+, e linhagens complementadas serão selecionadas. Análises fenotípicas e bioensaios comparando a eficiência da infecção das linhagens mutantes, da complementada e do tipo selvagem serão realizadas utilizando os hospedeiros artrópodes *Dysdercus peruvianus* (percevejo manchador-do-algodão) e *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino).

REFERÊNCIAS

1. Gooday, G. W., Zhu, W. Y., & O'Donnell, R. W. (2006) What are the roles of chitinases in the growing fungus? FEMS Microbiology Letters 100(1-3), 387-391.
2. Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Silveira Schrank, I., Henning Vainstein, M., & Schrank, A (2004). Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. Res Microbiol 155(4), 245-251.
3. Junges A., Boldo JT, Souza BK, Guedes RL, Sbaraini N, Kmetzsch L, Thompson CE, Staats CC, de Almeida LG, de Vasconcelos AT, Vainstein MH, Schrank A (2014). Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. PLoS One, v. 9, p.16.