

Thaiane Rispoli¹, Virgínia Carla de Almeida Falcão¹, Ângela Junges¹ e Augusto Schrank¹

¹-Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (CBiot/UFRGS).

1. Introdução

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentososo que infecta uma ampla diversidade de hospedeiros artrópodes. A infecção ocorre pela penetração direta através da cutícula do hospedeiro que é composta por quitina (30%). As quitinases são uma das famílias de hidrolases que estão envolvidas na dissolução do exoesqueleto quitinoso dos hospedeiros. Nos fungos, as quitinases estão envolvidas em morfogênese e nutrição. Análises de genomas mostram que entre 10 e 35 genes de quitinases estão presentes em fungos filamentosos. A análise *in silico* do genoma da linhagem E6 de *M. anisopliae* identificou 23 genes que provavelmente codificam para quitinases. As quitinases propostas foram categorizadas em quatro subgrupos de acordo com a sua proximidade filogenética e organização estrutural. Apesar do número de quitinases já isoladas ou descritas em fungos leveduriformes e filamentosos ser amplo, estudos envolvendo a descrição exata da função dessas quitinases ainda são escassos. Sendo *M. anisopliae* um entomopatogênico com alta capacidade de infecção, a determinação da função das quitinases que podem estar presentes neste organismo e o estudo detalhado deste sistema quitinolítico representa uma perspectiva de estudo importante para a melhor compreensão do processo de infecção e características fenotípicas. Estudos anteriores do grupo mostraram que o gene *chiMaA4* de *M. anisopliae* E6 apresenta níveis de transcritos similares em diferentes tipos celulares: micélio cultivado em meio rico (MCC), em meio contendo GlcNAc (0,25%) como única fonte de carbono e em meio contendo quitina 1%, micélio autolisado, conídio, apressório e blastosporo. Estamos, assim, construindo mutantes nulos para determinar as funções deste gene, utilizando como estratégia PCR de fusão das regiões flanqueadoras do gene *chiMaA4* interrompidas pela região do *cassette* de expressão do gene de resistência *bar*. Os mutantes funcionais serão caracterizados quanto a sua morfologia celular e suas características de infecção serão caracterizadas a partir de bioensaios em laboratório para determinar a sua função.

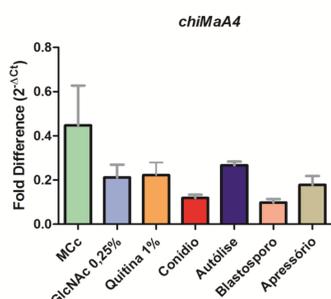


Fig.1. Níveis de transcritos de *chiMaA4* em diferentes meios de cultivo em comparação ao meio actina. O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* E6 foi cultivado em meios contendo diferentes fontes de carbono e em diferentes tipos celulares e apresentou níveis de expressão aproximados entre as diferentes condições (Junges, A., 2010).

2. Materiais e Métodos

2.1. Desenho dos primers: Foram selecionadas duas regiões do gene de interesse (*chiMaA4*) contendo 1000 pb para realizar o desenho dos primers e também foi selecionada a região do *cassette* de expressão do gene *bar*, o qual confere resistência ao glifosinato de amônio.

2.2. Amplificação das regiões do gene de interesse (1° round): Realizou-se a amplificação das regiões 5', 3' do gene *chiMaA4* e do *cassette* para expressão do gene de resistência *bar*. DNA de *M. anisopliae* linhagem E6 foi utilizado como molde para amplificar as regiões de interesse 5' e 3'. As regiões amplificadas constituirão a construção para deleção do gene.

2.3. Purificação dos produtos de PCR: Cada produto de amplificação de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose, de modo a efetuar uma purificação de bandas específicas de cada região de interesse. As bandas consistiam de 1000 pb para as regiões 5' e 3', e 1880 pb para a região *bar*. Seguiu-se o protocolo de purificação de DNA a partir de gel de agarose (*kit GFX-GE healthcare*).

2.4. Fusão das regiões 5', 3' e *bar* (2° round): As amostras purificadas da primeira amplificação foram utilizadas como molde para a reação de PCR do 2° round a fim de fusionar o *cassette* de expressão do gene *bar* às regiões 5' e 3' (Yu et al., 2004). O produto resultante foi de 3880 pb.

2.5. Amplificação do *cassette* de deleção do gene *ChiMaA4* (3° round): A partir do produto fusionado do 2° round, realizou-se uma reação de amplificação, utilizando os primers *Nested*. Estes flanqueiam toda a região de deleção do gene *chiMaA4* de 3880 pb.

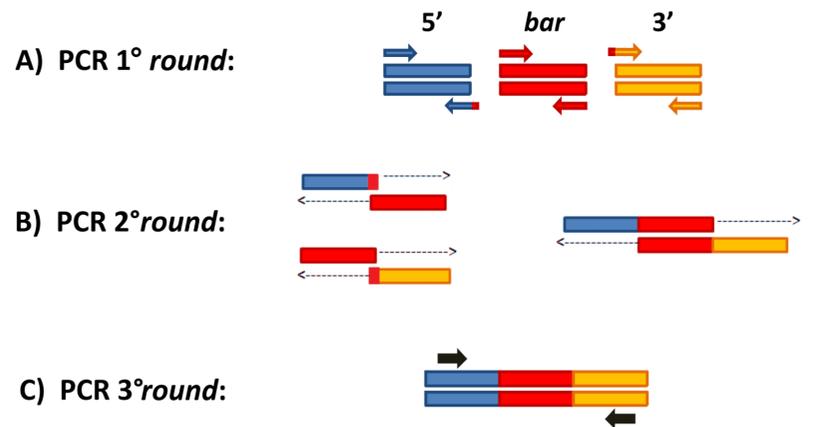


Fig.2. Esquema de construção do *cassette* de deleção do gene *chiMaA4*. Através da reação de fusão, os fragmentos de DNA da região 5', 3' e da marca de resistência *bar* foram fusionados. (A) PCR 1° round: amplificação das regiões 5' e 3' do gene de interesse e da marca de resistência (*bar*). (B) PCR 2° round: fusão dos três fragmentos. (C) PCR 3° round: amplificação da construção fusionada, utilizando os primers *Nested*.

3. Resultados

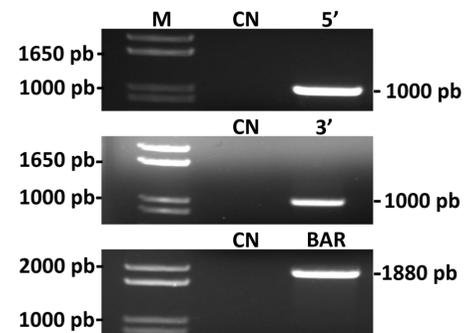


Fig.3. Amplificação das regiões do gene de interesse (1° round). Amplificação das regiões 5', 3' do gene *chiMaA4* em 1000 pb e do *cassette* para expressão do gene de resistência *bar* em 1880 pb. M- marcador 1Kb *Plus DNA Ladder*, CN – controle negativo, 5', 3' e BAR – regiões de interesse amplificadas.

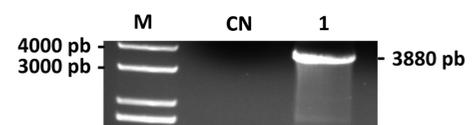


Fig.4. Amplificação do *cassette* de deleção do gene *chiMaA4* (3° round). Amplificação das regiões 5' e 3' fusionadas ao *cassette* de expressão de *bar*. M- marcador 1Kb *Plus DNA Ladder*, CN – controle negativo, 1 – regiões de interesse amplificadas.

4. Conclusões

- 4.1. Todas as reações de PCR do 1° round foram amplificadas com sucesso.
- 4.2. Ocorreu a fusão do *cassette* de expressão do gene *bar* às regiões 5' e 3' a partir da amplificação do produto do 1° round.
- 4.3. Amplificou-se o *cassette* de deleção do gene *chiMaA4* (PCR 3° round).

5. Perspectivas

- 5.1. Construir mutantes nulos para a quitinase ChiMaA4 através da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Michielse et al., 2004).
- 5.2. Caracterizar as alterações fenotípicas resultantes dessa deleção.

6. Referências Bibliográficas

- 6.1. Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous, 2004.
- 6.2. Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi, 2004.

7. Apoio Financeiro

CAPES, CNPq, FAPERGS.