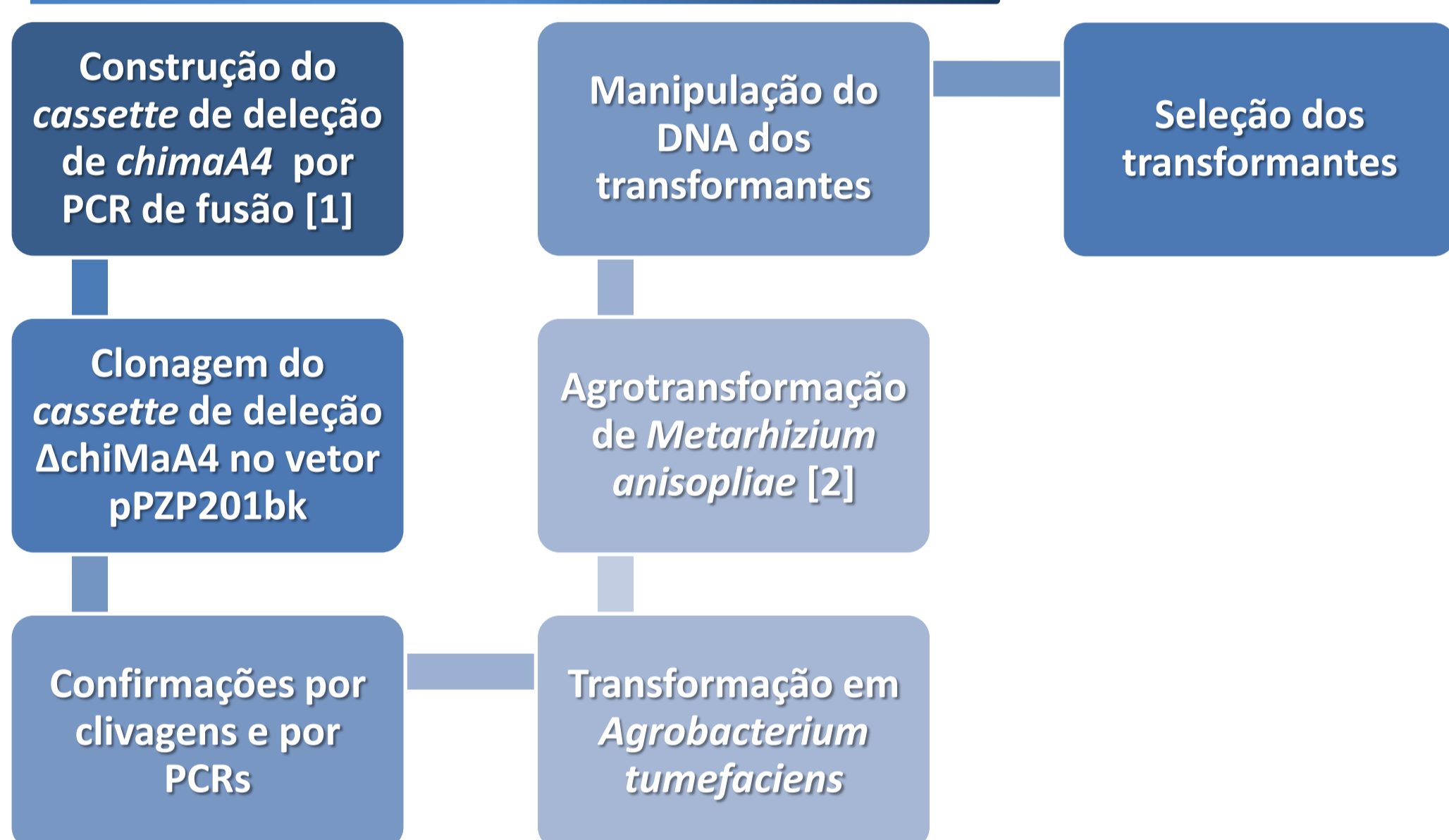


## INTRODUÇÃO

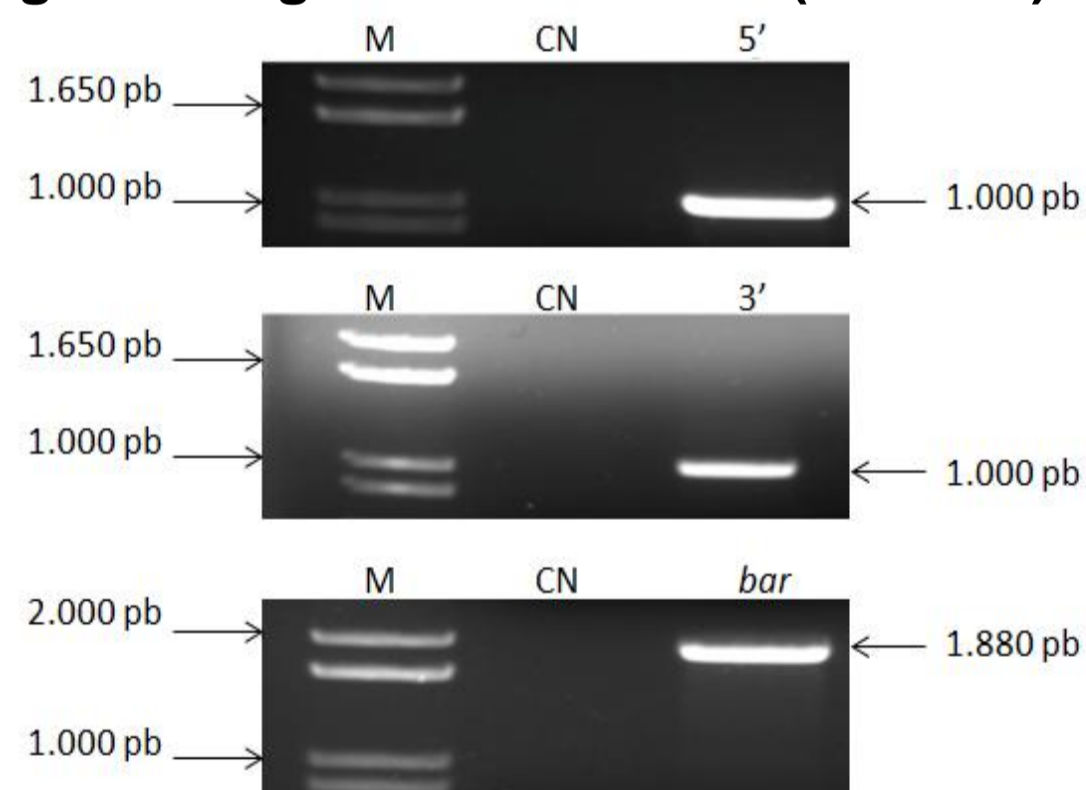
*Metarhizium anisopliae* é um dos modelos mais bem estudados de fungo entomopatogênico. A propriedade do fungo que mais se busca compreender é o mecanismo de infecção que ocorre pela penetração direta deste na carapaça do hospedeiro composta por quitina. A quitina é o principal componente estrutural da cutícula dos artrópodes, a qual fornece uma proteção contra agentes infectivos. Ela também está presente como um componente majoritário na parede celular dos fungos. Sabe-se que este processo de infecção envolve a combinação de vários fatores, dentre eles a secreção de enzimas hidrolíticas, como as quitinases as quais atuam na dissolução do exoesqueleto quitinoso do hospedeiro. Análises de genomas mostram que entre 10 e 35 genes de quitinases estão presentes em fungos filamentosos e uma análise *in silico* do genoma da linhagem E6 de *M. anisopliae* identificou 24 genes que provavelmente codificam para quitinases. 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. Estudos anteriores do grupo mostraram que a quitinase ChiMaA4 do subgrupo A de *M. anisopliae* E6 apresenta níveis de transcritos similares em diferentes tipos celulares e sob diferentes meios de cultivo. Nosso objetivo é determinar a função desta quitinase do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* através da construção de mutantes nulos e sua posterior caracterização das alterações fenotípicas resultantes dessa deleção, utilizando como metodologia a geração de mutantes por *Agrobacterium tumefaciens*.

## METODOLOGIA



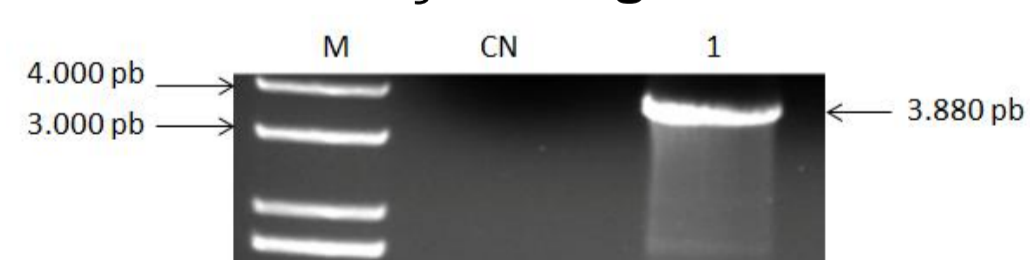
## RESULTADOS

### ✓ Amplificação das regiões do gene de interesse (1ª round).



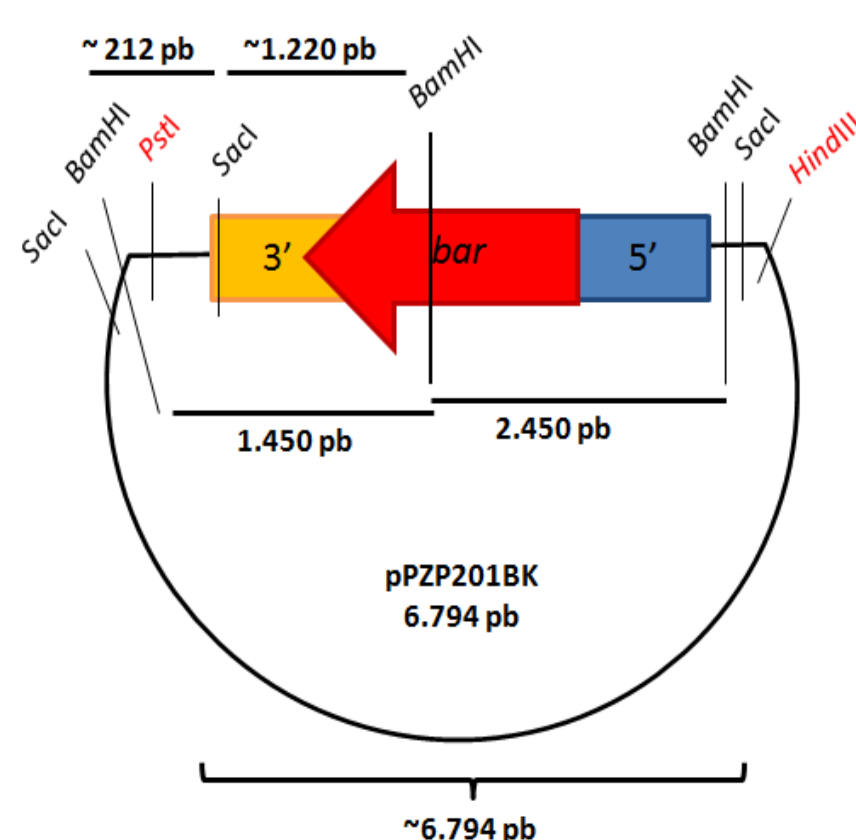
Amplificação das regiões 5', 3' do gene *chimaA4* em 1.000 pb e do cassette para expressão do gene de resistência *bar* em 1.880 pb. M- marcador 1Kb Plus DNA Ladder, CN – controle negativo, 5', 3' e *bar* – regiões de interesse amplificadas.

### ✓ Amplificação do cassette de deleção do gene *chiMaA4* (3ª round).

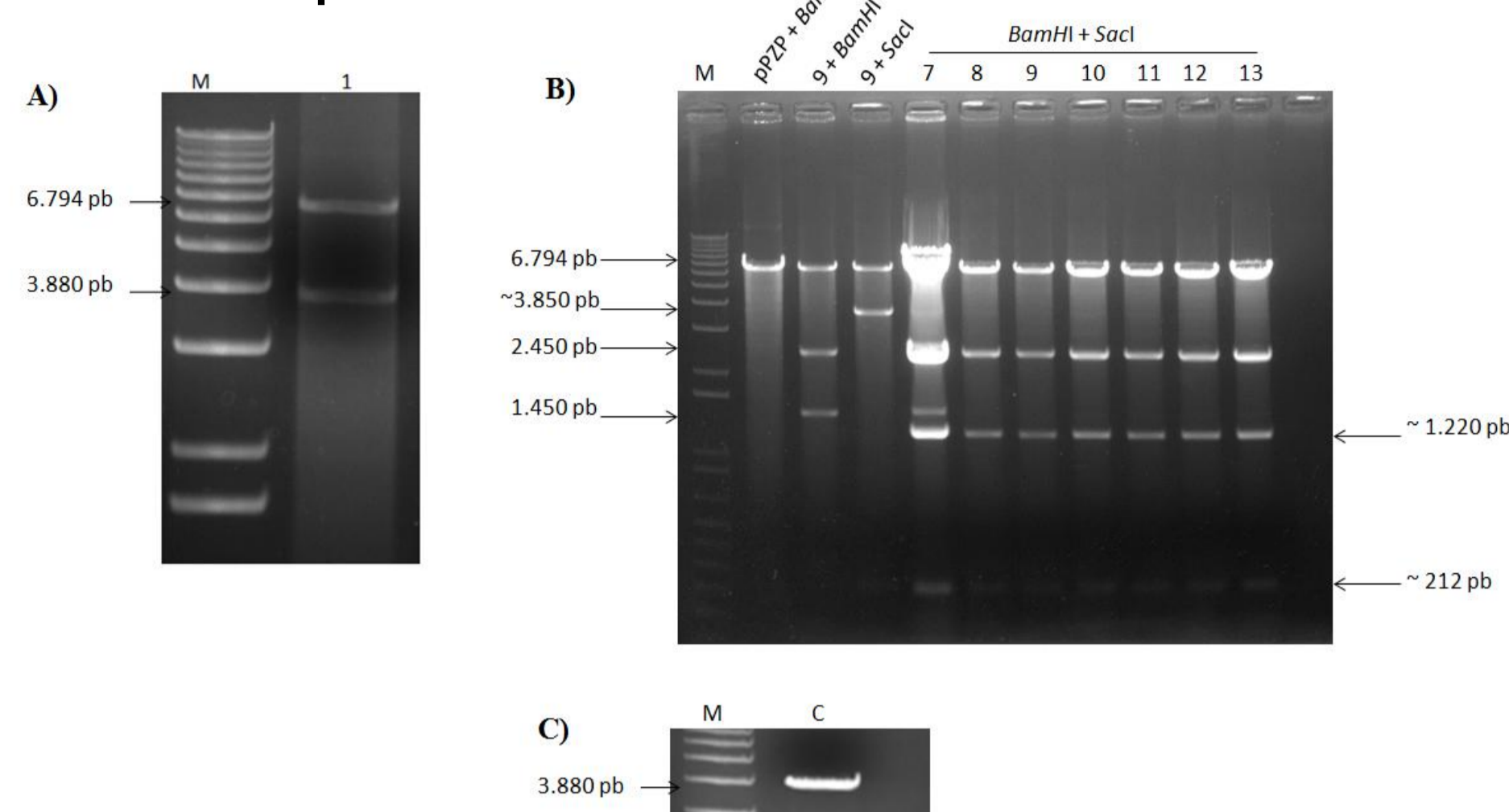


Amplificação das regiões 5' e 3' fusionadas ao cassette de expressão de *bar* utilizando os primers Nested. M- marcador 1Kb Plus DNA Ladder, CN – controle negativo, 1 – regiões de interesse amplificadas.

### • Representação esquemática da construção do plasmídeo pPZP::ΔchiMaA4::bar.

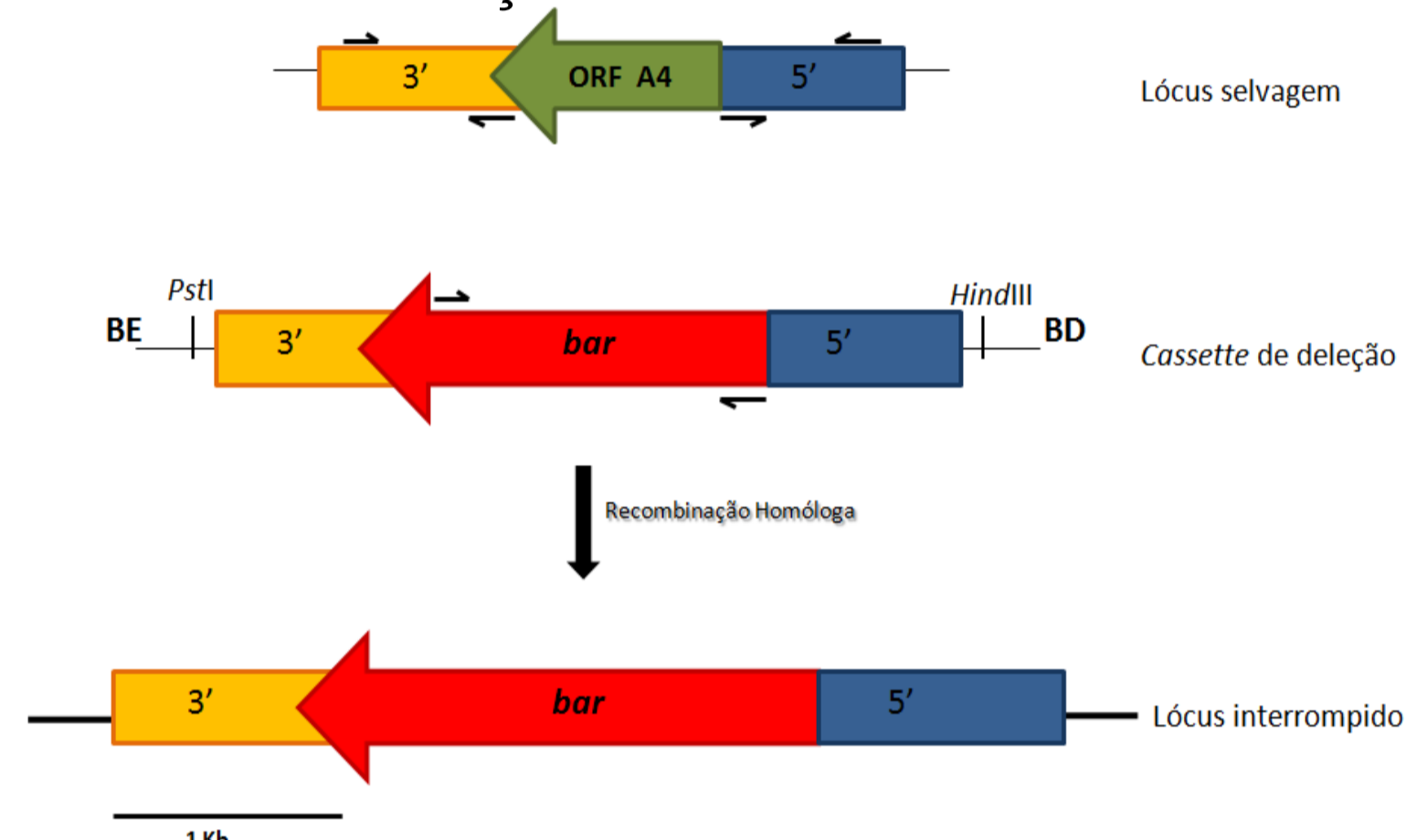


### ✓ Confirmação da clonagem e orientação do cassette de deleção ΔchiMaA4 no vetor pPZP201BK

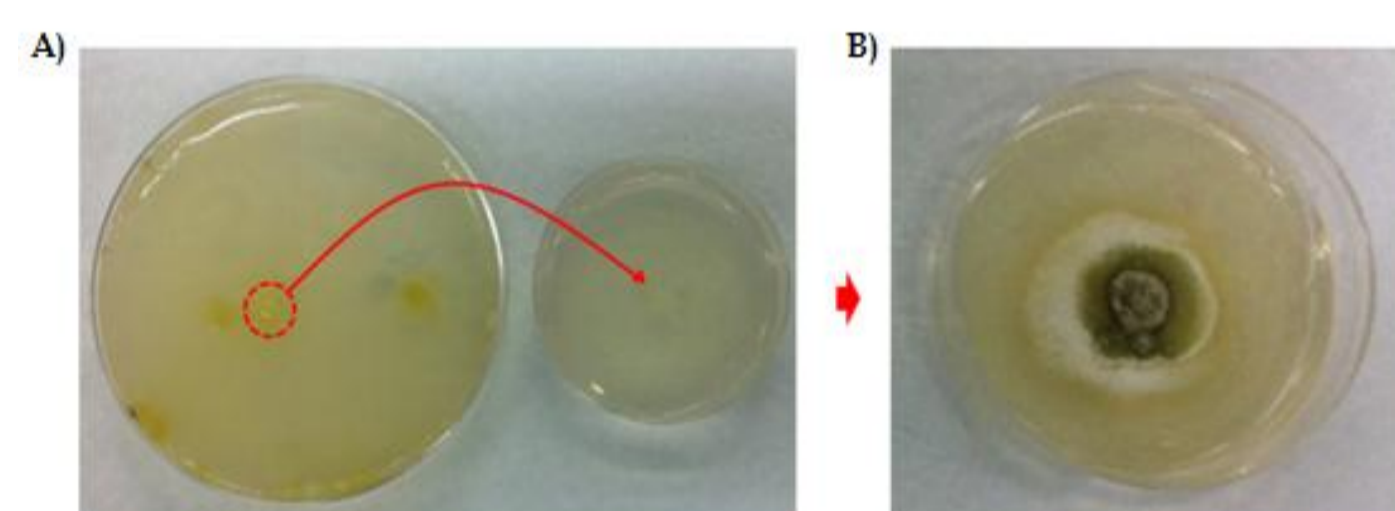


A) Clivagem com as enzimas de restrição *PstI* e *HindIII*. M= marcador 1kb plus DNA ladder; 1= amostra de DNA plasmidial com liberação do cassette de deleção (3.880 pb) e do vetor pPZP201BK (6.794pb). B) Perfil da clivagem do pPZP::ΔchiMaA4::bar com as enzimas de restrição *BamHI* e *SacI*. 7, 8, 9, 10, 11, 12, e 13= amostras de DNA plasmidial com o cassette clivadas. C) Confirmação por PCR da construção. C= cassette de deleção ΔchiMaA4.

### ✓ Esquema do cassette de deleção

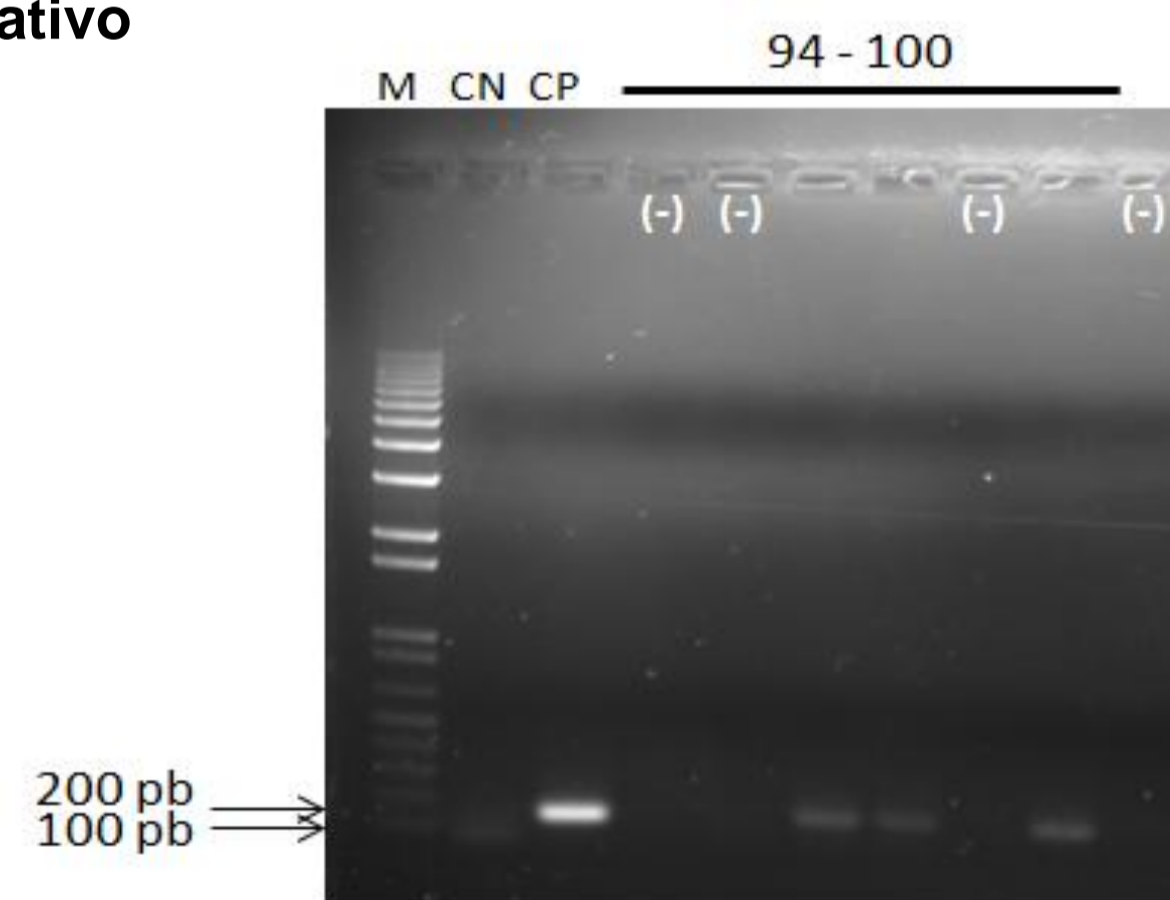


### ✓ Agrotransformação de *M. anisopliae* e seleção dos 300 transformantes



A) Isolamento das hifas dos possíveis transformantes em meio contendo glifosinato de amônio. B) Crescimento de um isolado.

### ✓ Seleção dos transformantes com inserção do cassette de deleção por PCR negativo



Representação de apenas 7 transformantes. M= marcador 1Kb plus DNA ladder, CP= controle positivo (DNA da linhagem E6 de *M. anisopliae*) com 200 pb; CN= controle negativo; (94-100)= transformantes testados pela PCR com os primers *chiA4qPCR\_F1* e *chiA4qPCR\_R1*; (-)= ausência da amplificação de 200 pb (possível recombinação homóloga).

## PERSPECTIVAS

- Confirmar, pela metodologia de *Southern blot*, a ausência da região codificante do gene *chimaA4* (recombinação homóloga) após a seleção dos transformantes pela PCR negativa.
- Analisar o padrão de transcrição dos mutantes do gene *chimaA4* por RT-PCR, utilizando a linhagem E6 como controle positivo.
- Realizar análises fenotípicas nos mutantes em condições de indução e repressão do sistema quitinolítico, bem como analisar os processos de germinação, crescimento de hifas, esporulação, formação de apressório e formação de blastosporo.
- Analisar os mutantes através de bioensaios quanto a sua capacidade de infecção em hospedeiros artrópodes como o percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* e com o carrapato *Rhipicephalus microplus*.

## REFERÊNCIAS

- [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 fungi, 2004.  
[2] Staats CC, Junges A, Fitarelli M, Furlaneto MC, Vainstein MH, Schrank A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*, 2007.