



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2013
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Estudo funcional da quitinase ChiMaA4 no fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>
<b>Autor</b>	THAIANE RISPOLI SERRANO
<b>Orientador</b>	AUGUSTO SCHRANK

*Metarhizium anisopliae* é um dos modelos mais bem estudados de fungo entomopatogênico, principalmente no que diz respeito à utilização de abordagens moleculares para o estudo do processo de infecção em seus hospedeiros. Neste contexto, 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 esse 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. As quitinases propostas foram categorizadas em quatro subgrupos (A, B, C e D) 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. 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*. Primeiramente foi realizada a construção do *cassette* de deleção de ChiMaA4 pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de sobreposição (*overlapping*), sendo amplificadas e fusionadas as regiões flanqueadoras do gene *chimaA4* e o *cassette* para expressão do gene *bar* (marca para a seleção dos transformantes). Este *cassette* de deleção  $\Delta$ chiMaA4 foi clonado no vetor pPZP201BK e confirmações por clivagens com diferentes pares de enzimas de restrição e PCR foram realizadas. Posteriormente, o vetor pPZP:: $\Delta$ chiMaA4::bar foi transformado em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 por eletroporação. As células de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor pPZP:: $\Delta$ chiMaA4::bar foram utilizadas para agrotransformação de *M. anisopliae*. A busca pelo mutante de *M. anisopliae*, contendo o *cassette* de deleção  $\Delta$ chiMaA4 está sendo realizada. O DNA extraído de cada transformante está sendo submetido a PCR com diferentes pares de *primers* para a confirmação da recombinação homóloga do *cassette* no genoma do fungo. Em sequência, será analisado o fenótipo do mutante construído, através de análises das alterações morfológicas e da caracterização dos processos de germinação, crescimento de hifas, esporulação, formação de apressório e formação de blastosporos nos mutantes obtidos. Seguidamente, analisaremos o mutante quanto a sua capacidade de infecção em hospedeiros artrópodes através de bioensaios no percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* e no carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, quitinase, mutante nulo, agrotransformação.

Financiamento: CNPq, CAPES, FAPERGS, LNCC, PPGBCM.