



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Estudo funcional das quitinases do subgrupo D de <i>Metarhizium anisopliae</i>
Autor	NICOLAU SBARAINI OLIVEIRA
Orientador	AUGUSTO SCHRANK

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é considerado modelo para estudos das interações entre patógenos e seus hospedeiros devido a sua alta capacidade de infectar diferentes artrópodes. Para infectar seus hospedeiros *M. anisopliae* deve primeiramente romper a cutícula do inseto, composta majoritariamente por quitina, um componente comum a insetos e fungos. Para romper a cutícula, o fungo produz diversas enzimas hidrolíticas, dentre as quais estão as quitinases. As quitinases não atuam somente em processos nutricionais, mas também apresentam funções morfogênicas e autolíticas, atuando em diferentes etapas do desenvolvimento do fungo e na manutenção do seu ciclo de vida. Estas enzimas são caracterizadas pela presença do domínio de glicosil hidrolase 18 (GH18). Atribuir a função dessas quitinases em cada um desses processos é um dos objetivos de estudo em fungos entomopatogênicos. Uma análise genômica realizada em nosso laboratório, na linhagem E6 de *M. anisopliae*, identificou vinte e quatro quitinases que foram categorizadas em quatro subgrupos, sendo nove pertencentes ao subgrupo A, sete ao B, quatro ao C e quatro a um novo subgrupo D. As quitinases do subgrupo D são as que mais diferem em relação as vinte e quatro. Estudos de genes ortólogos a esses em outros fungos mostraram que, mesmo possuindo o domínio GH18 que caracteriza as quitinases, sua função é diferente das outras, não atuando diretamente na hidrólise de quitina, e sim na maturação de glicoproteínas. Considerando que a função dos genes do subgrupo D em *M. anisopliae* ainda é desconhecida, o presente estudo visa avaliar, através da construção de mutantes funcionais, a função das quitinases do subgrupo D e a conservação destes genes em outras linhagens do fungo. Foram utilizadas amostras de DNA de 23 linhagens de *M. anisopliae* para avaliar, pela técnica de PCR, a presença de cada um dos quatro genes do subgrupo D descritos no genoma da linhagem E6 nestas linhagens. Os resultados mostraram que os genes *chimaD1* e *chimaD2* estão presentes em todas as linhagens, enquanto o gene *chimaD3* está ausente em alguns isolados e a análise de *chimaD4* ainda está em andamento. Utilizando a metodologia de PCR de sobreposição (*overlapping*) foi realizada a construção do *cassette* de deleção para os quatro genes, sendo amplificadas e fusionadas as regiões flangeadoras de cada gene com a marca de resistência para glifosinato de amônia, o gene *bar*. Esses *cassettes* foram então clonados no vetor pCR2.1-TOPO (TOPO[®] TA Cloning[®] Kit, Invitrogen). Posteriormente será utilizada a metodologia de *Agrotransformação* para a produção dos mutantes nulos a partir da inserção desses *cassettes* no genoma do fungo. Também será realizada a análise do fenótipo dos fungos transformantes, a fim de avaliar possíveis alterações na morfologia e virulência de *M. anisopliae*, as quais permitirão a caracterização da função das quitinases do subgrupo D neste fungo.