

INTRODUÇÃO

Os elementos de transposição (*Transposition Elements*, TEs) são sequências de DNA móveis amplamente distribuídos no genoma dos seres vivos e que se multiplicam através de mecanismos de cópia e inserção (classe I) ou excisão e inserção (classe II). Em fungos fitopatogênicos, a atividade de TEs pode estar associada a evolução rápida de novos genes codificantes de pequenas proteínas efetoras, além de reorganizações do genoma que podem contribuir para a evolução da fitopatogenicidade. O genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da Vassoura-de-bruxa em cacau (*Theobroma cacao*), contém uma série de elementos repetitivos ativos (Mondego *et al.*, 2008) que podem estar relacionados a evolução do genoma e de aspectos relacionados à fitopatogenicidade no gênero (Rincones *et al.*, 2006). Uma das estratégias mais usadas para o isolamento de transposons ativos é chamada de *transposon trapping* e baseia-se na característica de movimentação e inserção dos TEs no genoma (Cove, 1976). Inativações nos genes de assimilação de nitrato por inserções de TEs são comumente utilizadas para a seleção por resistência ao seu análogo tóxico clorato (Figura 1).

Para testar a influência da atividade de TEs em genes próximos a elementos ativos, é necessária a obtenção de técnicas de manipulação genética que viabilizem manipulações precisas no genoma de modo a permitir o estudo do papel biológico destes genes-alvo. Em fungos isso é obtido através de recombinação homóloga sítio específica utilizando marcadores de seleção. É descrito em fungos filamentosos que linhagens carregando um alelo nocaute para um dos componentes do heterodímero protéico Ku70/Ku80 tornam-se deficientes no sistema de reparo de DNA NHEJ (*Non Homologous End Joining*) e apresentam um fenótipo de maior taxa de recombinação homóloga, viabilizando a estratégia de genômica funcional de genes-alvo através da obtenção de nocautes (Krappman, 2007).

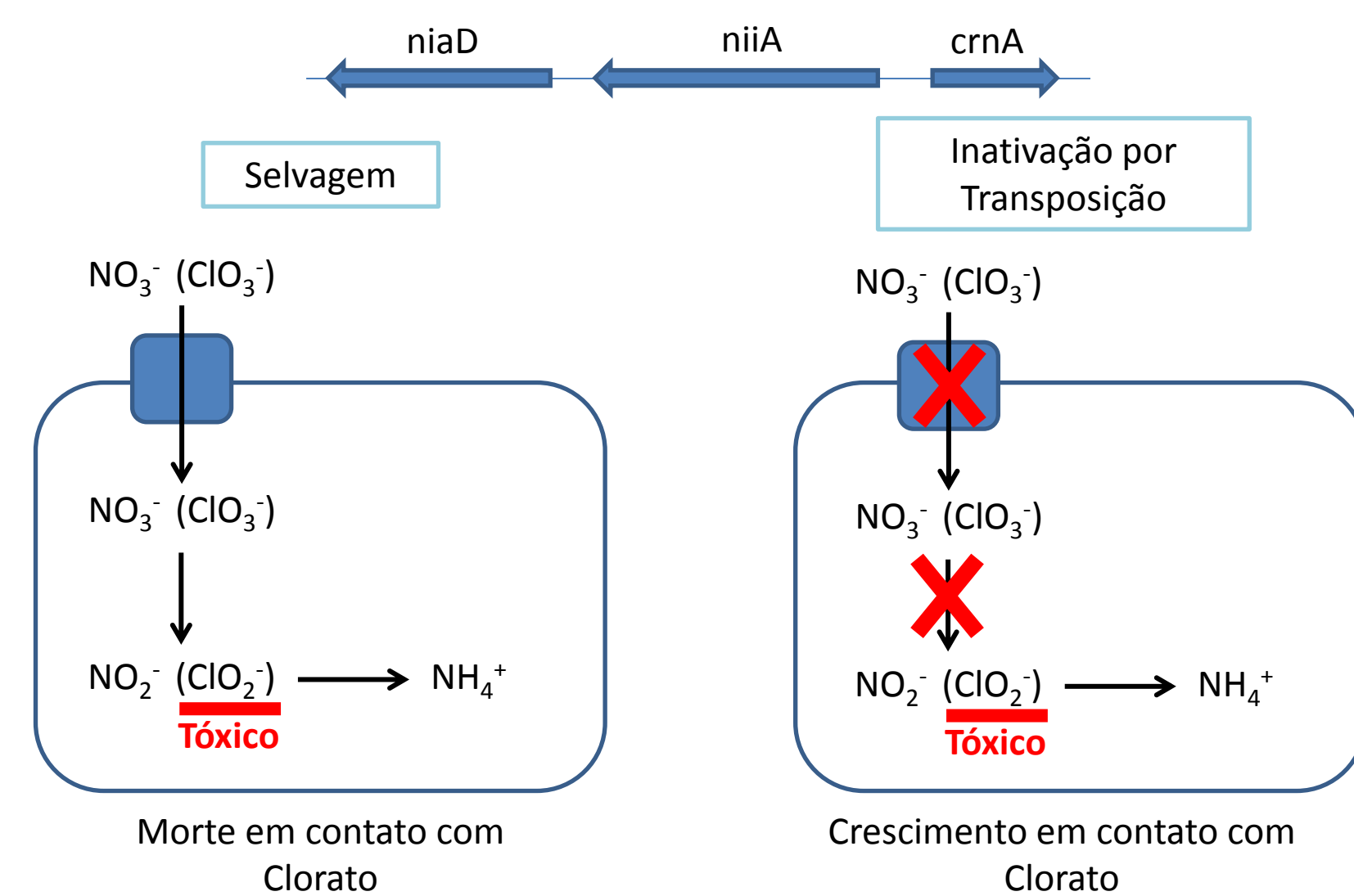


Figura 1. *Transposon trapping*

METODOLOGIA

Linhagens: *Moniliophthora perniciosa* (CP02, BP10, APS1, WMA5, FA553, FPN1) e *Moniliophthora* sp. (SscB).

Transposon Trapping:

- Identificação dos genes de assimilação do nitrato (referência: proteínas de *Aspergillus nidulans*) e montagem de oligos: tBLASTn e preditor gênico AUGUSTUS.
- Ensaio da susceptibilidade em clorato: crescimento em meio de cultura com concentrações crescentes do sal clorato de potássio.
- Transposon trapping* em *Moniliophthora perniciosa*: stress de 37°C por 24h com posterior inóculo em meio sólido contendo sal de clorato.

Gene targeting

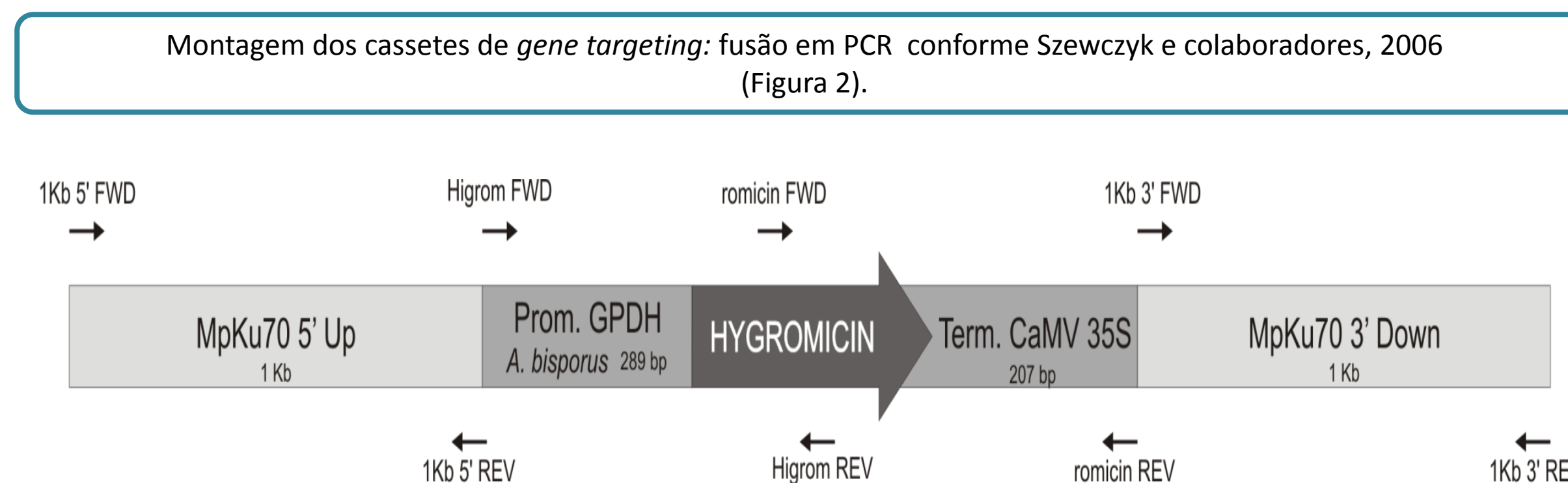


Figura 2. Cassete formado por 1kb das regiões cromossômicas 5' e 3' flanqueadoras do gene *MpKu70* e pelo marcador de seleção (gene que confere resistência ao antibiótico controlado pelo promotor *gpd* e terminador CaMV 35S).

- Seleção preliminar dos transformantes possíveis nocautes para *MpKu70*: screen por PCR visando a amplificação da junção entre a região 5' do locus de integração homóloga do cassete de deleção e o gene *hph* contido no meio do cassete e seqüenciamento.
- Análise da expressão de *MpKu70* dos possíveis nocautes: Real Time qPCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transposon trapping

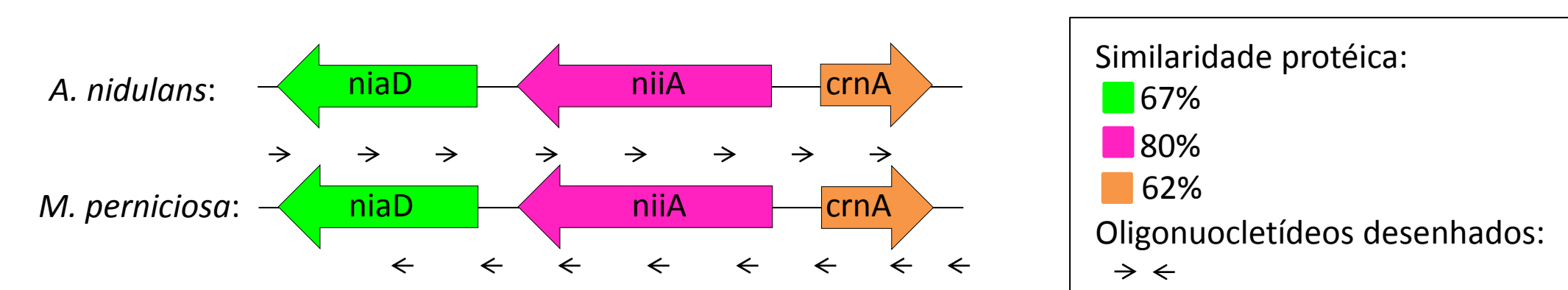


Figura 3. Comparação dos genes de assimilação do nitrato entre *A. nidulans* e *M. perniciosa*. No cluster de *M. perniciosa* estão representados os oligonucleotídeos desenhados.

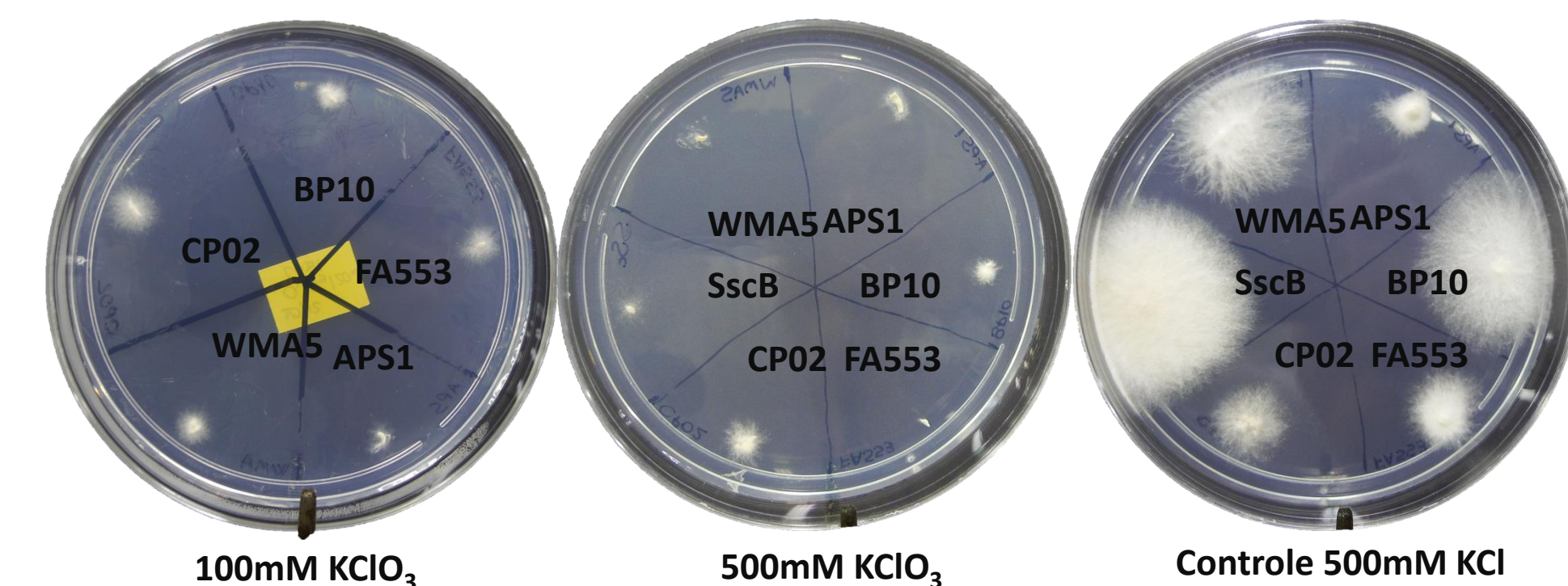


Figura 4. Resultado do teste de susceptibilidade ao sal de clorato em meio mínimo.

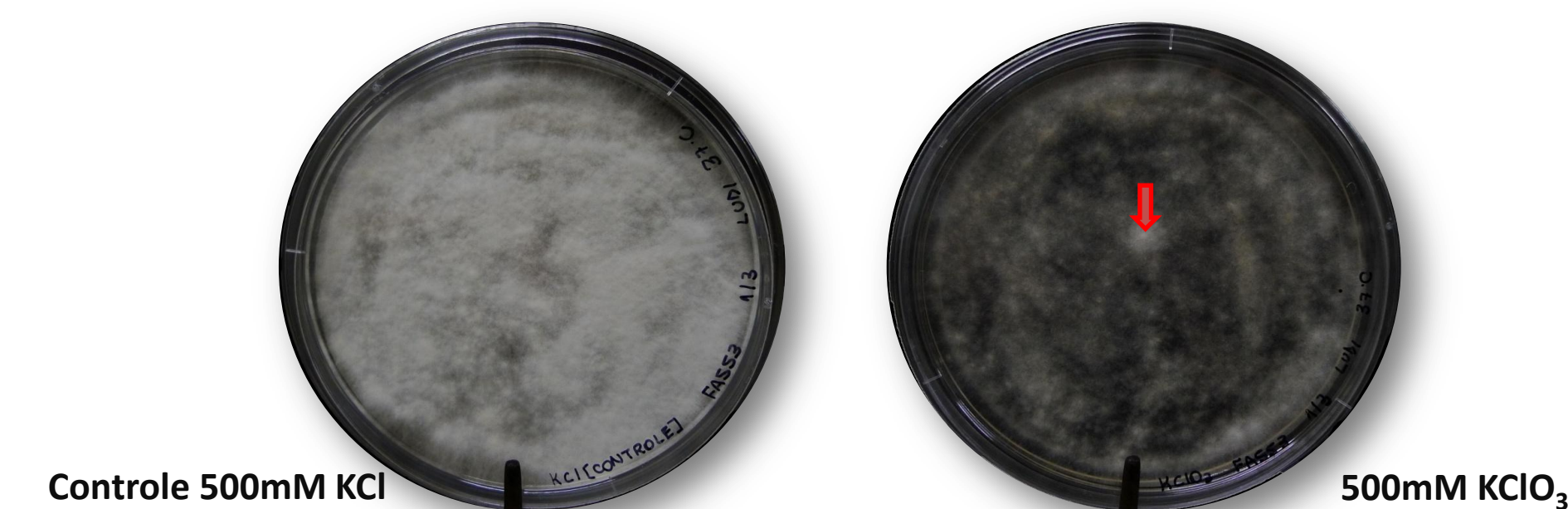


Figura 5. Screen piloto com sal de clorato. A seta destaca uma possível colônia resistente.

O crescimento residual observado do fungo pode ser devido ao uso de nitrogênio proveniente de hifas mortas pelas sobreviventes, já que nesta estratégia foi utilizado uma quantidade alta de unidades formadoras de colônia. Para a verificação dos mutantes resistentes ao clorato, deve ser realizada a transferência de colônias para cultura contendo este sal e outras fontes de nitrogênio, a fim de identificar os possíveis genes da via mutados. Com a confirmação da resistência, as próximas etapas são a extração do DNA das linhagens resistentes com posterior amplificação por PCR usando os oligos desenhados para a verificação de eventuais transposições.

Gene targeting

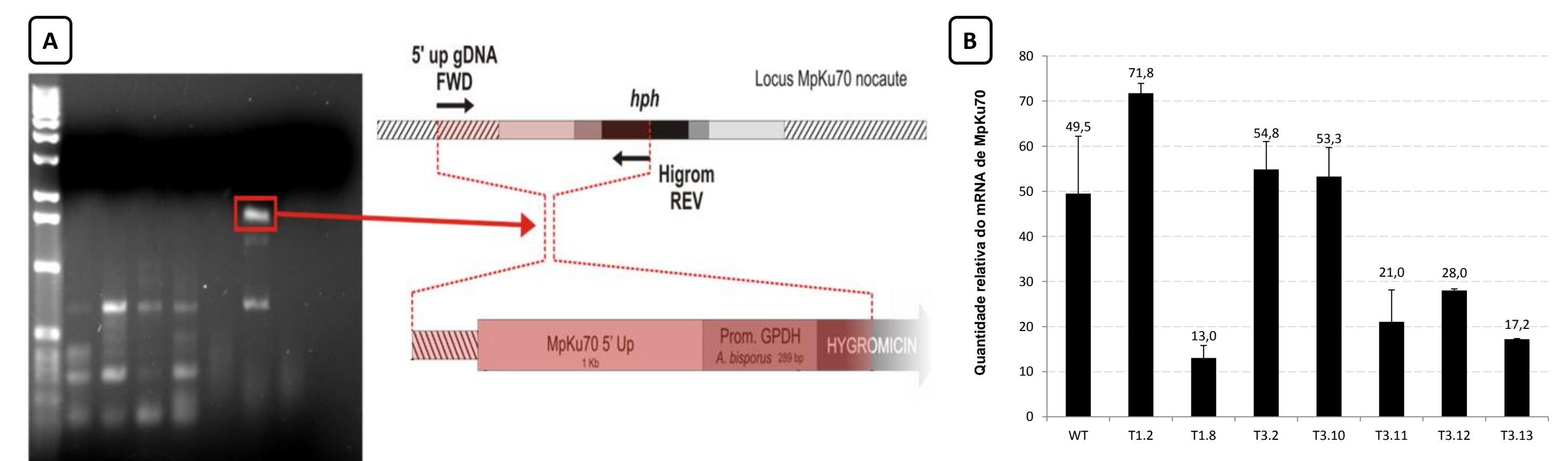


Figura 3. A - Esquema da confirmação dos possíveis nocautes para o gene *MpKu70*. No gel de agarose está em destaque a banda de 1800 bp, correspondente a região entre 5' do locus de inserção e o gene *hph* presente no cassete. B - Análise da expressão gênica do gene *MpKu70* nas linhagens possíveis nocaute obtidas através da transformação com o cassete completo (T1.N) e da co-transformação com RNA dupla-fita de *MpKu70* (T3.N) comparadas com a expressão de linhagem controle selvagem (WT).

Transformantes com metade da expressão do gene *MpKu70* em relação ao tipo selvagem pode ser resultado da transformação de apenas um núcleo do micélio dicariótico, havendo a formação de um heterocárior, em que não houve a compensação da expressão pelo alelo selvagem. Considerando os transformantes em que houve a indução ou níveis normais de expressão, o que sugere a compensação pelo alelo selvagem presentes no heterocárior ou a seleção de falsos positivos. Isso apenas poderá ser analisado através da realização de *Southern blotting* e genotipagem completa.

CONCLUSÕES

A confirmação da susceptibilidade do fungo ao sal de clorato corrobora o resultado obtido *in silico* da presença dos genes de assimilação de nitrato no *M. perniciosa*, o que possibilita a utilização da estratégia de *transposon trapping* e sua otimização.

A estratégia de *gene targeting* se mostra promissora, sendo necessário a confirmação dos mutantes obtidos por *Southern blotting* e a otimização da técnica.

BIBLIOGRAFIA

- Cove, 1976. *Heredity*. 36: 191–203.
- Krappmann *et al.*, 2007. *Molecular Microbiology*. 21:25-29.
- Mondego *et al.*, 2008. *BMC Genomics*. 9: 548.
- Rincones *et al.*, 2006. *Mycol. Res.* 110: 821-32.
- Szcwzyk *et al.*, 2006. *Nature protocols*. 1(6):3111-20.