



A proteína fluorescente *far-red* Katushka é um eficiente *gene-reporter* para a descoberta de novos promotores em *Metarhizium anisopliae*

Desenvolvimento de ferramentas para o estudo do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Augusto B. Penteriche¹, Augusto Schrank^{1, 2}

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

² Rede Avançada em Biologia Computacional (RABICÓ);

Introdução

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico que infecta uma vasta gama de hospedeiros artrópodes, diversos deles de importância social e econômica, como pragas de lavoura e vetores de doenças animais e humanas. Esporos de *M. anisopliae* possuem elevado potencial de reduzir o uso de pesticidas químicos, mas ainda são pouco eficazes. Assim, o presente trabalho busca melhorar o repertório de ferramentas moleculares para o estudo de *M. anisopliae*, a partir da caracterização de novas sequências promotoras endógenas pelo uso da proteína fluorescente *far-red* Katushka (Kat) como *gene-reporter*.

Metodologia

1. A fim de avaliar se o gene *Kat* seria funcional em *M. anisopliae*, o mesmo foi clonado sob controle do promotor da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *Aspergillus nidulans* (gpdA), e transformado em *M. anisopliae*, gerando diversos transformantes (como gpdA-Kat.10 representado na **Figura 1A**). Para verificar se seria possível detectar a fluorescência durante a infecção, besouros (*Ulomoides dermestoides*) foram infectados com 10⁶ esporos de *M. anisopliae* E6 (WT) e transformante (gpdA-Kat.10) (**Figura 1B**).

2. Para aferir se a expressão do gene *Kat* afetaria a virulência dos transformantes, ensaios de virulência foram conduzidos com larvas de *Tenebrio molitor*. Os ensaios foram realizados com *M. anisopliae* WT e quatro linhagens transformantes (gpdA-Kat.1, .4, .8 e .10) (**Figura 2**).

3. Com o objetivo de avaliar se o gene *Kat* poderia ser utilizado para a descoberta de novos promotores, construções contendo este gene e regiões de 1000, 750 e 500 pares de base (pb) à montante do genes gamma-actina, beta-tubulina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPDH); além de 510 e 300 pb à montante do gene *trp1* (todos genes endógenos de *M. anisopliae*) foram feitas. As 11 construções foram transformadas independentemente no fungo gerando os mutantes descritos na **Figura 3**.

Resultados

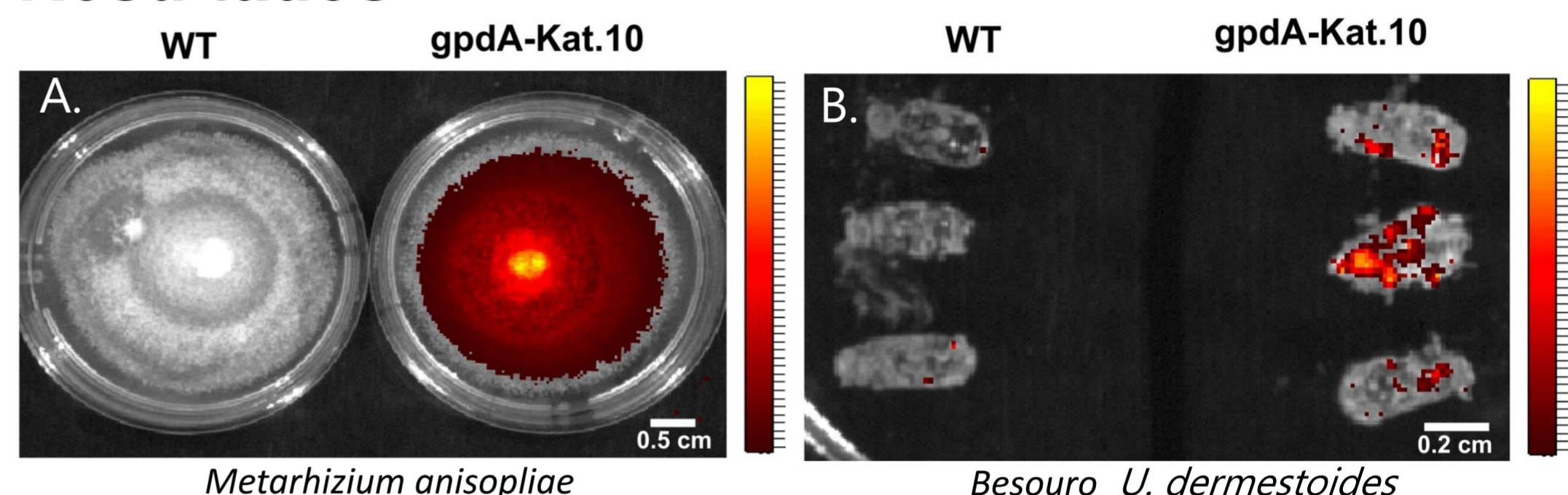


Figura 1. Detecção de *far-red* Katushka *in vivo* no fungo e no hospedeiro infectado.

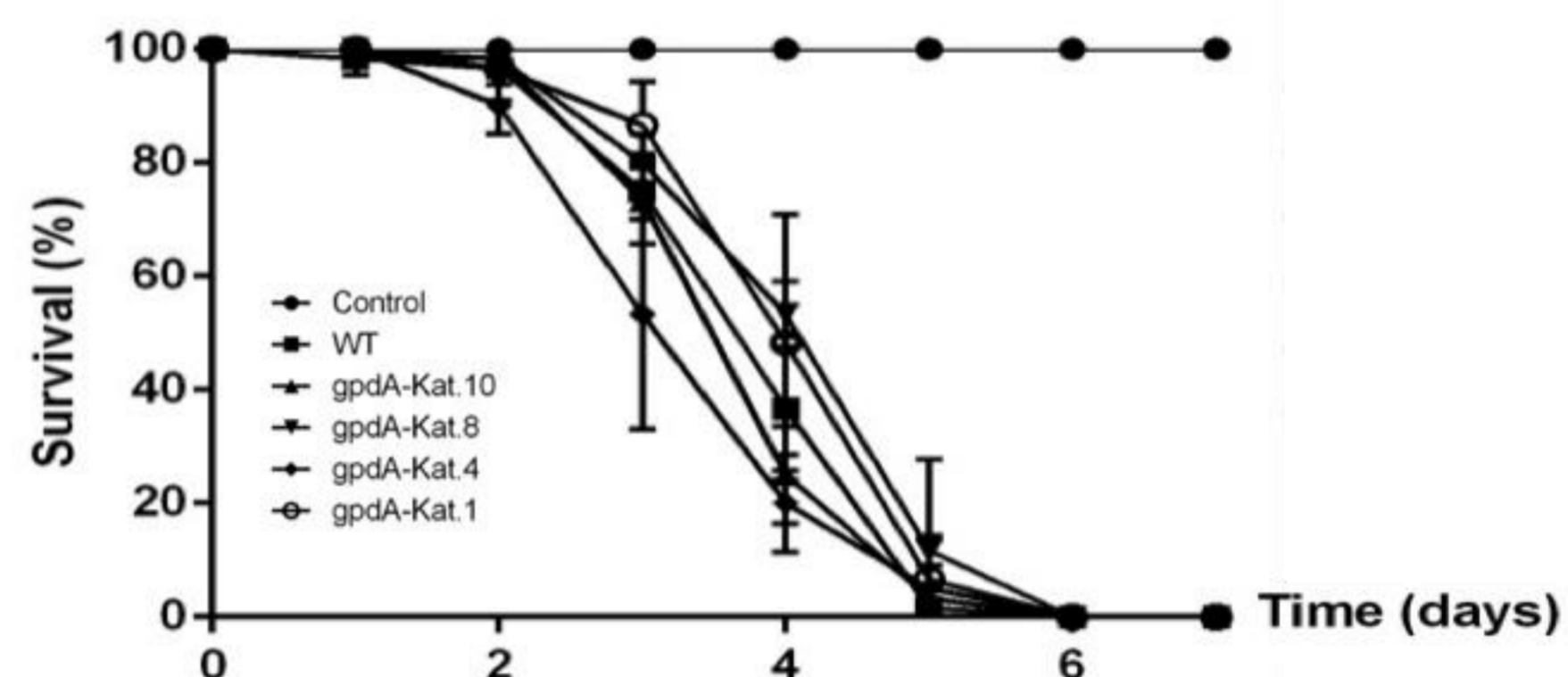


Figura 2. Ensaio de virulência com larvas de *T. molitor*.

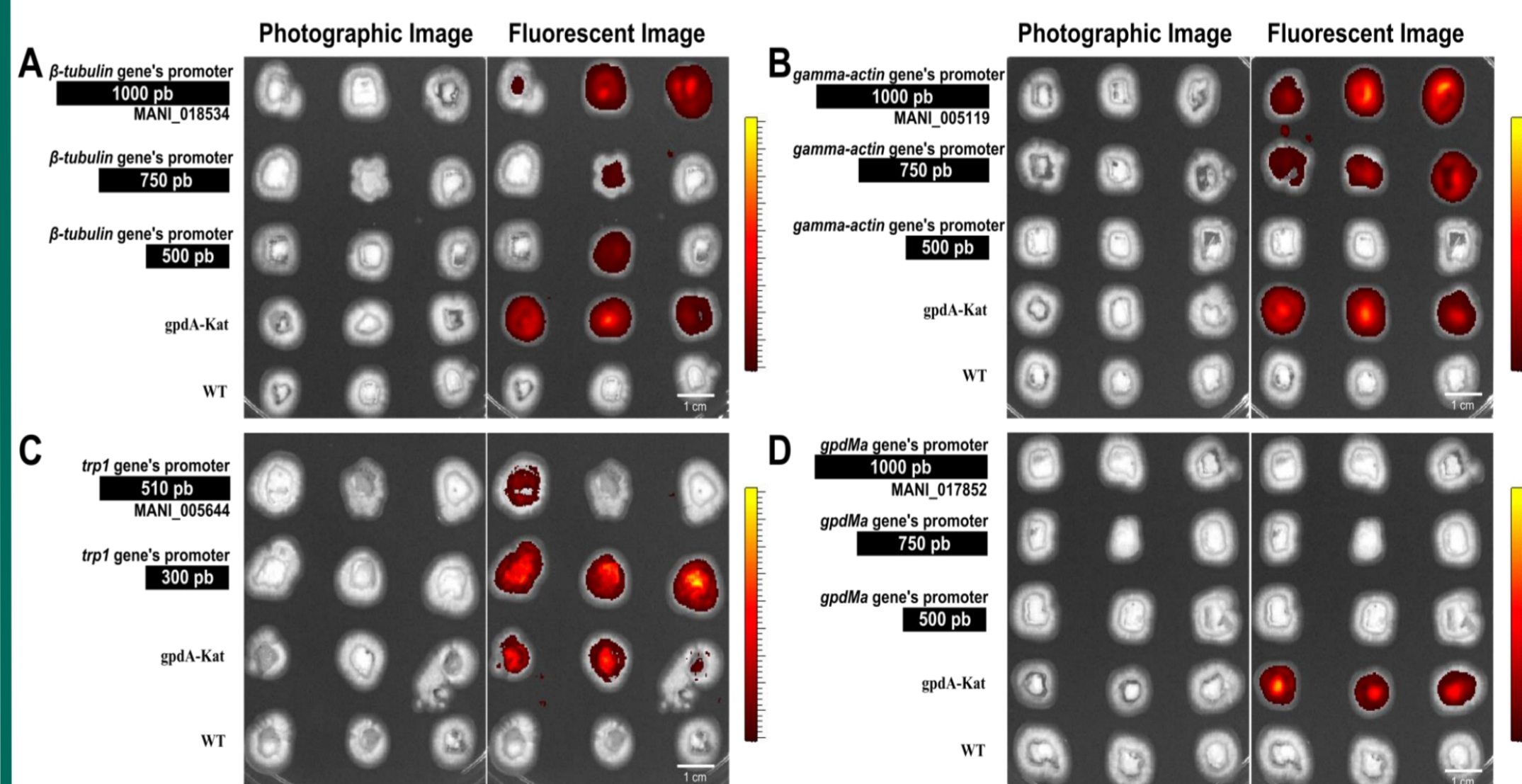


Figura 3. Determinação da região promotora por fluorescência de *Katushka*. (A) Beta tubulina, (B). Gama actina, (C) *trp1*; (D) GPDH.

Conclusão

A proteína Katushka é expressa e sua fluorescência é detectada em *M. anisopliae*. Essa proteína não causa alterações no padrão de virulência do fungo. Assim, o gene Katushka pode ser empregado como um *reporter* eficiente para identificação de sequências promotoras e para o estudo do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.