

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Clonagem de dois genes de quitina sintase de *Magnaporthe oryzae* em vetor para a transformação de arroz

Guilherme Codenonsi da Fonseca

Porto Alegre,
Novembro de 2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Clonagem de dois genes de quitina sintase de *Magnaporthe oryzae* em vetor para a transformação de arroz

Guilherme Codenonsi da Fonseca

Monografia apresentada como quesito parcial para a obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ênfase Molecular, Celular e Funcional

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Margis

Porto Alegre,
Novembro de 2008

Resumo

O arroz (*Oryza sativa*) é uma planta de grande importância alimentar sendo o alimento básico da dieta de mais da metade da população mundial. O fungo *Magnaporthe oryzae* é o patógeno responsável pela doença brusone do arroz que causa graves prejuízos a cultura dessa planta. A quitina é um dos principais polissacarídeos constituintes da parede celular dos fungos e é muito importante para a sua viabilidade. A quitina sintase é a enzima que polimeriza esse polissacarídeo e existem até sete classes dessa proteína em fungos. O presente trabalho buscou a construção de um vetor para a transformação de arroz que produza moléculas de dupla fita de RNA (dsRNA) correspondentes à parte da seqüência do produto de dois genes da quitina sintase de *M. oryzae* com o objetivo de tornar a planta resistente a esse fungo ao desencadear o processo de interferência por RNA (RNAi). Como alvos para o silenciamento gênico por RNAi foram utilizados os genes das quitinas sintases de classe I e III. Para a obtenção dos fragmentos dos genes da quitina sintase e para a construção do vetor foram delineados oligonucleotídeos para a amplificação de parte desses dois genes. Com o objetivo de ordenar os dois fragmentos em tandem foi utilizada uma região de seqüência comum entre os genes para a delimitação do oligonucleotídeo *reverse* de um gene e *Forward* do outro. O RNA total do fungo foi extraído e posteriormente foi sintetizado o cDNA utilizando o oligonucleotídeo T25V. Os fragmentos foram então amplificados utilizando os oligonucleotídeos específicos de cada gene. Os produtos dessa reação foram utilizados juntos em uma nova reação de PCR para a formação da seqüência em tandem. Esse fragmento foi então inserido no vetor pENTR-D/TOPO e posteriormente recombinado no pANDA que é específico para a produção de moléculas de dsRNA.

Palavras-chave: *Magnaporthe oryzae*; fitopatógenos; *Oryza sativa*; Quitina sintase; RNAi.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 4 |
| 2. Objetivos..... | 8 |
| 3. Metodologia..... | 9 |
| 3.1. Material biológico..... | 9 |
| 3.2. Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNAs..... | 9 |
| 3.3. Ferramentas de bioinformática..... | 9 |
| 3.4. Reações de PCR..... | 10 |
| 3.5. Clonagem dos produtos de PCR nos vetores pGEM-T Easy, pENTR/D-TOPO e pANDA..... | 10 |
| 3.6. Perfil de restrição..... | 11 |
| 3.7. Seqüenciamento de DNA..... | 11 |
| 4. Resultados e discussão..... | 13 |
| 5. Perspectivas..... | 19 |
| 6. Referências bibliográficas..... | 20 |

1. Introdução

O arroz (*Oryza sativa*) é uma planta de grande importância alimentar já que é um elemento básico da dieta de mais da metade da população mundial, fazendo parte de 27% da energia e 20% das proteínas consumidas *per capita* nos países em desenvolvimento (1). Na Ásia mais de dois bilhões de pessoas obtém de 60 a 70% das calorias consumidas através do arroz (2).

A produção brasileira de arroz está entre as dez maiores do mundo (3). Para o ano de 2008 a colheita nacional é estimada em 11,995 milhões de toneladas, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional respondendo por 59,7% deste montante, cerca de 7,1 milhões de toneladas (4). Estima-se que a produção mundial de arroz deverá crescer 40% até 2030 para atender a demanda mundial por esse cereal (5). Esse crescimento irá enfrentar um cenário ambiental com um número cada vez menor de áreas cultiváveis e de recursos hídricos disponíveis (5).

Doenças e pragas de insetos que afetam o arroz são responsáveis pela redução de até 25% de sua produção mundial de acordo com dados das nações unidas (5). Entre as mais sérias doenças que afetam o arroz está a brusone causada pelo fungo filamentoso *Magnaporthe oryzae*. Em 2002 duas linhagens distintas de *Magnaporthe grisea* foram identificadas e descritas como diferentes espécies (6). As linhagens associadas ao gênero *Digitaria* mantiveram a nomenclatura original e as linhagens associadas ao arroz e a outras gramíneas relacionadas receberam o nome científico de *M. oryzae* (6).

A brusone do arroz causa anualmente perdas de 10 a 30% da colheita desse cereal (7). No Japão a brusone causa perdas de até um quarto da produção e demanda gastos da ordem de 1.8 milhões de Euros na utilização de fungicidas (5). No Brasil e no Rio Grande do Sul é considerada a doença mais importante que afeta as lavouras de arroz (8, 9).

Fungicidas, cultivares resistentes, práticas agrônômicas e técnicas de biotecnologia têm sido desenvolvidas e utilizadas como controle dessa doença (5, 8). No Rio Grande do Sul a principal estratégia de controle tem sido o uso de

cultivares resistentes devido ao impacto ambiental que o uso de fungicidas proporciona (8), entretanto por causa da grande variabilidade existente nas linhagens do fungo *M. oryzae* (10) estas plantas tem a resistência perdida após alguns anos de cultivo.

A brusone do arroz atinge todos os estágios de desenvolvimento do arroz desde a semente até a planta madura em praticamente todos os tecidos, infectando principalmente as folhas, o caule e as panículas (brusone do pescoço). A brusone do pescoço é a principal causa de perdas na lavoura já que provoca diminuição na produção de grãos (5, 11, 12).

O ciclo de vida do fungo *M. oryzae* tem início com a adesão do esporo na superfície do tecido da planta. Após uma rápida germinação (cerca de duas horas) ocorre a diferenciação do tubo germinativo em apressório, essa estrutura será a responsável pela penetração do fungo aos tecidos da planta rompendo a cutícula, atravessando a parede celular da epiderme e formando a hifa de infecção após 24 a 30 horas do inóculo (5). Dentro das células da epiderme ocorre a formação de hifas de crescimento secundárias que resultarão na colonização do tecido invadido e na formação de lesões necróticas após 5 a 6 dias do inóculo, ocorrendo a destruição do tecido e o início da esporulação do fungo (5). Os esporos serão dispersos pelo vento, disseminando a doença.

A parede celular dos fungos tem função tanto na sua proteção, como uma barreira inicial de contato a ambientes hostis, quanto na infecção do hospedeiro, abrigando muitas moléculas hidrolíticas e tóxicas necessárias a invasão do nicho ecológico pelo fungo (13). A parede celular dos fungos filamentosos é composta por alguns tipos de polissacarídeos sendo a quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, um dos seus constituintes principais (14). Durante o crescimento vegetativo sua síntese ocorre na ponta das hifas, em pontos de ramificação e nos septos (14). A quitina tem importância fundamental na viabilidade dos fungos e já foi documentado que a inibição da síntese de quitina leva a morte celular (15).

A quitina sintase (QS) é a enzima responsável pela produção desse polissacarídeo. Quitina sintases de fungos filamentosos e leveduras podem ser

divididos em até 7 classes de acordo com a sua seqüência de aminoácidos (15, 16, 17). Em alguns fungos filamentosos tem sido demonstrado que cada quitina sintase de um organismo contribui diferentemente para a morfogênese e viabilidade desse organismo (14, 15, 16).

No fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* um estudo demonstrou que a quitina sintase de classe III parece ser a mais importante para o desenvolvimento vegetativo e duplo mutantes para os genes de quitina sintase de classe I e III foram os que desenvolveram a menor densidade de hifas e uma menor massa celular (14). Em um estudo de identificação de quatro genes de quitina sintase de *M. oryzae* foi verificado que os genes que codificam as quitina sintases de classe I, III e IV (Tabela 1) são expressos durante todo o ciclo de vida do fungo, sendo o gene da quitina sintase de classe I o de maior nível de expressão (18).

O RNA de interferência (RNAi), também conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional, esta presente nas células de virtualmente todos os organismos multicelulares (19). Desde sua descoberta em 1998 evidências de diferentes tipos de silenciamento gênico mediados por RNAs de dupla fita (dsRNA) tem sido correlacionadas com a degradação de RNA mensageiro (mRNA), inibição da tradução, modulação da cromatina, metilação de DNA, silenciamento de DNA não pareado durante a meiose e mais drasticamente eliminação de DNA (20).

Em *M. oryzae* o processo de RNAi ocorre principalmente por degradação do mRNA sendo a molécula de dsRNA em grampo a mais eficiente para indução do processo de silenciamento gênico (21). O processo de silenciamento que envolve a degradação do mRNA é iniciado a partir de um RNA de fita dupla (dsRNA) que é reconhecido por uma enzima da família RNaseIII (Dicer) que cliva o dsRNA em fragmentos de 19 à 23 nucleotídeos (siRNAs). Posteriormente estes fragmentos serão reconhecidos pelas proteínas do complexo RISC e então iniciará a degradação do mRNA alvo através de sua hibridização à seqüência do siRNA (22).

Tabela 1. Quatro genes de quitina sintase de *M. oryzae* com suas respectivas classes de quitina sintase codificadas e números de acesso.

| Classe de QS | Genes de <i>M. oryzae</i> | Número de acesso |
|--------------|---------------------------|------------------|
| I | CHS3 | X96415.1 |
| II | CHS1 | X96413.1 |
| III | CHS2 | X96414.1 |
| IV | CHS4 | X96416.1 |

Em negrito estão indicados os genes clonados neste trabalho.

2. Objetivos

Este trabalho visa clonar fragmentos de dois genes de quitina sintase de *Magnaporthe oryzae* em um vetor plasmidial para a transformação em arroz (pANDA), com o intuito de gerar uma planta capaz de produzir moléculas de RNA de dupla fita (dsRNA) em grampo que terão como alvo dois genes da quitina sintase de classe I e III (expressos durante todo o ciclo de vida do organismo), produzindo uma linhagem potencialmente resistente à esse fungo.

3. Metodologia

3.1. Material biológico

Esporos de linhagens do fungo *Magnaporthe oryzae* (cultivares Fanny, Chuí, CICA 8 e Dular), cedidas pelo Dr. Gustavo R. D. Funck do IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz), foram cultivadas em meio semi-sólido de batata-dextrose-ágar (BDA) durante uma semana à temperatura ambiente em um fotoperíodo de 12 horas de luz e posteriormente conservados na geladeira a 14°C. As culturas do fungo foram renovadas a cada mês em novos meios de cultivo.

3.2. Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNAs

O DNA plasmidial de linhagens de *Escherichia coli* foram extraídos utilizando o PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante.

Aproximadamente 50 µl de hifas dos estoques de *M. oryzae* em meio semi-sólido foram inoculadas em três tubos contendo 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido, sem antibióticos, a temperatura ambiente durante 3 dias. Após esse período, 3 alíquotas de aproximadamente 0,25 ml de hifas foram coletadas e extraídas com 1 ml de reagente Trizol (Invitrogen) para a obtenção do RNA total (conforme as instruções do fabricante).

A síntese de cDNA foi realizada utilizando uma alíquota de aproximadamente 500 ng de RNA total e 1 µg do oligonucleotídeo T25V. Essa mistura foi desnaturada a 70°C por cinco minutos e imediatamente conservada em gelo. Posteriormente foram adicionados 200 U de transcriptase reversa MMLV (Promega), o tampão da enzima, 1 µl de dNTP (5 µM) e água para completar o volume final de 50 µl da reação que foi incubada a 40°C por uma hora.

3.3. Ferramentas de bioinformática

Para o delineamento de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2) foram utilizados os programas Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e Oligo Analyzer. Para

o alinhamento de seqüências de aminoácidos e nucleotídeos entre os produtos dos genes de quitina sintase de *M. oryzae* com o objetivo de delimitar o produto de amplificação dos dois genes foi utilizado o *software* Vector (Invitrogen). Para a confirmação das seqüências gênicas clonadas foi utilizado o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.4. Reações de PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando aproximadamente 50 ng de DNA (500 ng para cDNA), 0,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen), tampão da enzima, 1 µl de cloreto de magnésio (50 mM), 1 µl de DNTP (5 mM), 1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 µM) e água em um volume final de 20 µl. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial de 5 min. a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 50°C e 30 s a 72°C e mais um período de 5 min. a 72°C. Para amplificar os produtos maiores que 1000 pb, o tempo de alongação foi aumentado para 90 s. O tamanho dos produtos de amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos de PCR foram corados com SYBR[®] Green I (Molecular Probes), adicionado ao tampão de amostra. A análise de produtos de amplificação maiores que 1000 pb foi realizada em gel de agarose 1%.

3.5. Clonagem dos produtos de PCR nos vetores pGEM-T Easy, pENTR/D-TOPO e pANDA

A ligação do produto de PCR desejado em pGEM-T Easy foi realizada através de reação contendo a enzima T4 DNA ligase, conforme instruções do fabricante (Promega). O produto dessa reação foi transformado por eletroporação (22) na linhagem XL1 de *Escherenchia coli*. As bactérias transformadas foram incubadas por 18 horas a 37°C em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/ml), 20 µl IPTG e 40 µl X-Gal (22) para a seleção dos clones que possuíam o plasmídeo com o inserto de interesse.

A ligação do produto de PCR desejado no vetor pENTR-D/TOPO foi realizada seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). O plasmídeo foi transformado por choque térmico (22) em linhagens One Shot[®] Chemically Competent de *E. coli* (Invitrogen). As bactérias transformadas foram incubadas em meio LB-ágar contendo canamicina (100 µg/ml) por 18 horas a 37°C para a seleção dos clones com o plasmídeo de interesse.

O inserto do vetor pENTR/D-TOPO foi recombinado no vetor pANDA utilizando a enzima LR clonase conforme instruções do fabricante. O produto desta reação foi transformado em *E. coli* One Shot[®] Chemically Competent (Invitrogen) por choque térmico (22). As *E. coli* transformadas foram incubadas a 37°C por 18 horas em meio LB-ágar contendo canamicina e higromicina (ambas a 50 µg/ml) para a seleção dos clones que possuíam o plasmídeo de interesse.

3.6. Perfil de restrição

As reações com a enzima de restrição *Hind*III foram realizadas utilizando aproximadamente 250 ng do DNA plasmidial, 50 U de *Hind*III, tampão da enzima e água para completar um volume final de 15 µl. Essa mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. O DNA digerido foi corado com SYBR[®] Green I (Molecular Probes), adicionado ao tampão de amostra, e submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, para a confirmação do perfil de restrição dos clones obtidos.

3.7. Seqüenciamento de DNA

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando 2,5 pmoles do oligonucleotídeo desejado, aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial e água em um volume final de 3 µl. A essa mistura foi adicionado 0,25 µl do marcador BigDye Terminator[®] v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), 2 µl do tampão do marcador e 4,75 µl de água em um volume final de 10 µl. O seqüenciamento foi realizado utilizando o aparelho ABI 310 Genetic Analyzer. As condições de seqüenciamento foram: desnaturação inicial de 3 min. a 96°C seguida de 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 55°C e 4 min. a 60°C. O

Eletroferograma foi interpretado através do Software Sequence Analysis versão 5.1 (Applied Biosystems).

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos.

| Oligonucleotídeo | Seqüência de nucleotídeos |
|-------------------------|---|
| CHS3fa | 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACCATGTACAATGAGGATGAG-3' |
| CHS3r | 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGATCTCGCCACAGGCTCC-3' |
| CHS2f | 5'-CACCTATGTATAATGAGGACAAG-3' |
| CHS2r | 5'-GTGGTGTACTCGAAAATATG-3' |
| CHS3fb | 5'-CATATTTTCGAGTACACCAC-3' |
| GUSr | 5'-ATCCACGCCGTATTCGG-3' |
| GUSrf | 5'-CGAATACGGCGTGGAT-3' |
| GUSfr | 5'-CGTAAGTCCGCATCTTCATG-3' |
| M13 | 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' |
| Universalf | 5'- GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3' |
| Universalr | 5'-CACAGGAAACAGCTATGACC-3' |

4. Resultados e discussão

A identificação de uma região conservada na seqüência de aminoácidos entre o produto dos genes *CHS2* e *CHS3* (Tabela 1) foi realizada (dados não apresentados) com o objetivo de delimitar na seqüência de nucleotídeos correspondente a região a ser amplificada por PCR para a formação de fragmentos desses dois genes.

Para a amplificação do fragmento do gene *CHS3* foram utilizados os oligonucleotídeos CHS3fa e CHS3r (Tabela 2). O fragmento amplificado (571 pb) a partir do cDNA do fungo *M. oryzae* foi clonado no vetor pGEM-T Easy. Foi realizada reação de PCR com os primers CHS3fa e CHS3r para a confirmação da inserção do fragmento do gene *CHS3* ao plasmídeo (Figura 1). Também foi realizado o seqüenciamento desse vetor com a utilização dos oligonucleotídeos Universalf e Universalr (Tabela 2) que confirmou a clonagem do fragmento (dados não apresentados).

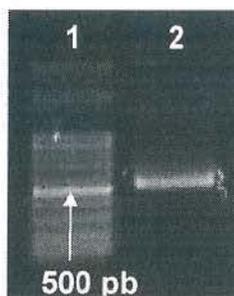
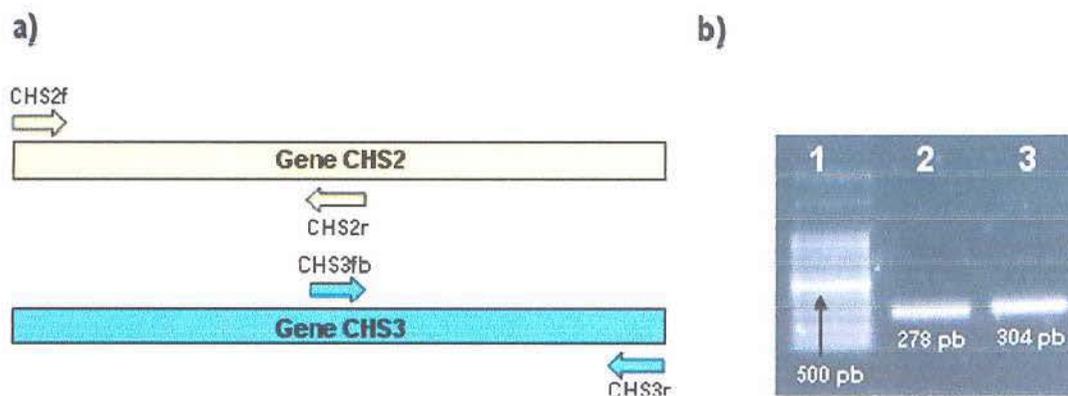


Figura 1. Gel de agarose 1,5% confirmando o tamanho de banda esperado (571 pb) da amplificação por PCR realizada com o do vetor pGEM-T Easy contendo o fragmento do gene de *CHS3* e os oligonucleotídeos CHS3fa e CHS3r. 1. Padrão de DNA contendo múltiplos de 100 pb. 2. Produto da reação de PCR.

Para a amplificação do fragmento do gene *CHS2* foram utilizados os oligonucleotídeos CHS2f e CHS2r (Tabela 2). O fragmento (278 pb), amplificado em reação contendo o cDNA de *M. oryzae*, foi misturado ao produto de amplificação de 304 pb obtido por PCR com os oligonucleotídeos CHS3fb e

CHS3r (Tabela 2) e o vetor pGEM-T Easy com o inserto do gene de *CHS3* (Figura 2).



Os oligonucleotídeos CHS2r e CHS3fb foram delineados a partir de uma região de 20 pb com alta homologia entre as seqüências dos genes *CHS2* e *CHS3* (Figura 3).

| | | |
|-------------|-----|--|
| <i>CHS2</i> | 228 | GGACGTCACGGCCAGGAGACTGTTGCTCATATTTTCGAGTACACCACTCAGCTGTCCGTCACCCCGAGCC |
| <i>CHS3</i> | 222 | GAAACGTCGACGACAAACCCACCACGGCCCATATTTTCGAGTACACCACCCAAATCGGCATGGCTCTCAAGA |

Figura 3. Alinhamento da seqüência dos genes de quitina sintase *CHS2* e *CHS3*, com destaque para a região de 20 pb com alta homologia entre as duas seqüências (a exceção de um par de bases). Com base nessa região foram delineados os oligonucleotídeos CHS2r e CHS3fb.

Foi realizada uma nova reação de PCR contendo a mistura dos dois produtos de amplificação, mas sem a utilização de oligonucleotídeos. A região homóloga aos dois genes agiu como seqüência iniciadora para a DNA polimerase utilizada (Figura 4.a). O produto dessa reação foi um fragmento de 562 pb contendo as seqüências dos genes *CHS2* e *CHS3* em *tandem* (Figura 4.b).

O fragmento *CHS2+CHS3* foi clonado no vetor pENTR-D / TOPO. Para a confirmação da ligação foi realizada reação de PCR com os oligonucleotídeos

CHS2f e CHS3r (Figura 5.a). Os plasmídeos que obtiveram o produto de amplificação esperado (562 pb) foram submetidos a uma reação com a enzima de restrição *HindIII*, que possui um sítio de clivagem somente no fragmento *CHS2+CHS3* (Figura 6). Os plasmídeos que contivessem o fragmento *CHS2+CHS3* seriam linearizados, migrando por eletroforese em gel de agarose em uma banda correspondente ao seu tamanho em pares de base (3138 pb). Os plasmídeos que não possuíssem esse fragmento não seriam linearizados por *HindIII* e migrariam em uma banda de tamanho menor devido a superhelicoidização do DNA circular. Dois clones apresentaram o tamanho esperado após eletroforese em gel de agarose (Figura 5.b). A seqüência do fragmento inserido foi confirmada por seqüenciamento utilizando os oligonucleotídeos CHS2f e M13 (dados não apresentados).

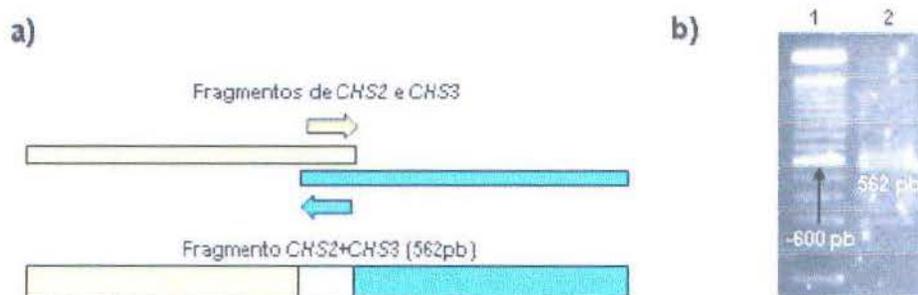


Figura 4. a) Esquema representando o anelamento na região homóloga aos dois fragmentos servindo como seqüência iniciadora. b) Gel de agarose 1,5% confirmando o fragmento amplificado que possui seqüências parciais dos genes *CHS2* e *CHS3* dispostas em tandem. 1. Padrão de DNA contendo múltiplos de 100 pb, 2. Fragmento *CHS2+CHS3*.

O fragmento *CHS2+CHS3* inserido no vetor pENTR/D-TOPO foi recombinado no vetor pANDA através de reação com a enzima LR Clonase (Invitrogen). A recombinação ocorre entre as seqüências attL1 e attL2 que flanqueiam o inserto no vetor pENTR/D-TOPO (Figura 6) e a seqüência AttR do vetor pANDA (Figura 7).

Para a confirmação da recombinação foram realizadas reações de PCR utilizando o vetor pANDA recombinado com o *inserto CHS2+CHS3* e os oligonucleotídeos GUSr e CHS3r ou CHS2r para um fragmento recombinado e com os oligonucleotídeos GUSrf e CHS3r ou CHS2r para o outro fragmento

(Figura 8). A confirmação da recombinação de ambos os fragmentos na orientação correta foi realizada através do seqüenciamento desse plasmídeo com os oligonucleotídeos GUSrf e GUSfr, que hibridizam na seqüência *gus linker* do vetor pANDA (Figura 8.a).

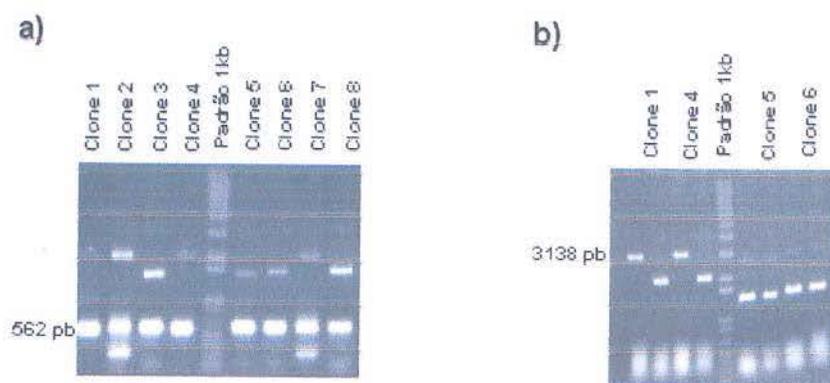


Figura 5. a) Produtos de amplificação por PCR utilizando os iniciadores CHS2f e CHS3r em gel de agarose 1,5%. b) Gel de agarose 1%. Os clones 1, 4, 5 e 6 foram digeridos em reação com a enzima *Hind*III, somente os clones 1 e 4 obtiveram o padrão esperado (para cada clone foram feitas reações com e sem enzima, respectivamente dispostas no gel).

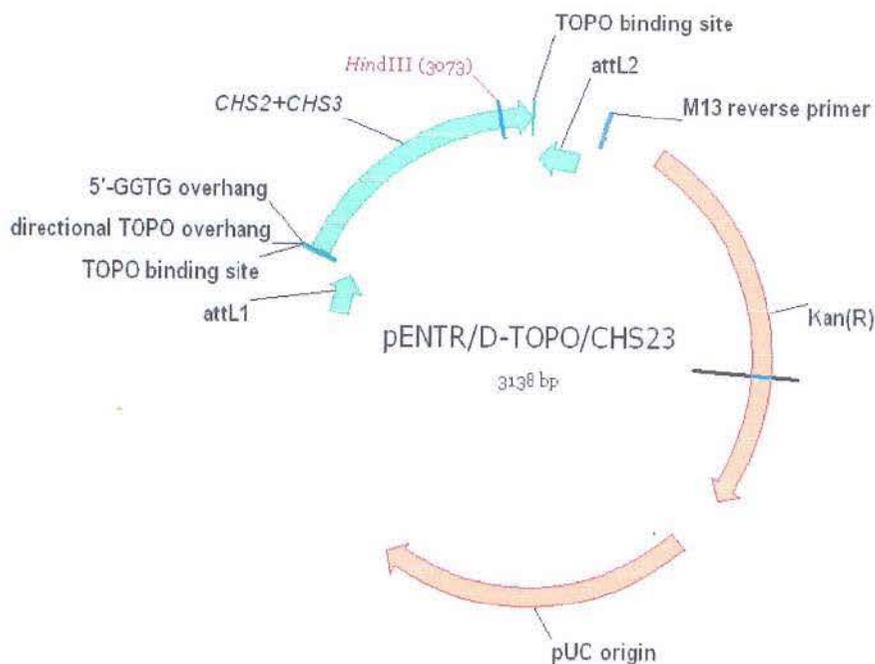


Figura 6. Vetor pENTR/D-TOPO com o fragmento *CHS2+CHS3*. Destaque para o sítio de clivagem da enzima *Hind*III.

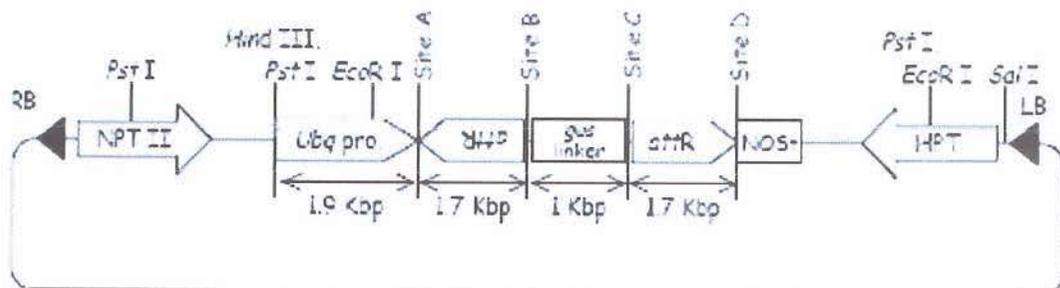


Figura 7. Esquema representando o vetor pANDA. Os fragmentos recombinados nesse vetor substituem as seqüências attR no mesmo sentido ilustrado na figura. Assim a partir do promotor de ubiquitina é polimerizado um mRNA com regiões complementares. Quando essas regiões se hibridizam é formado o dsRNA em forma de grampo.

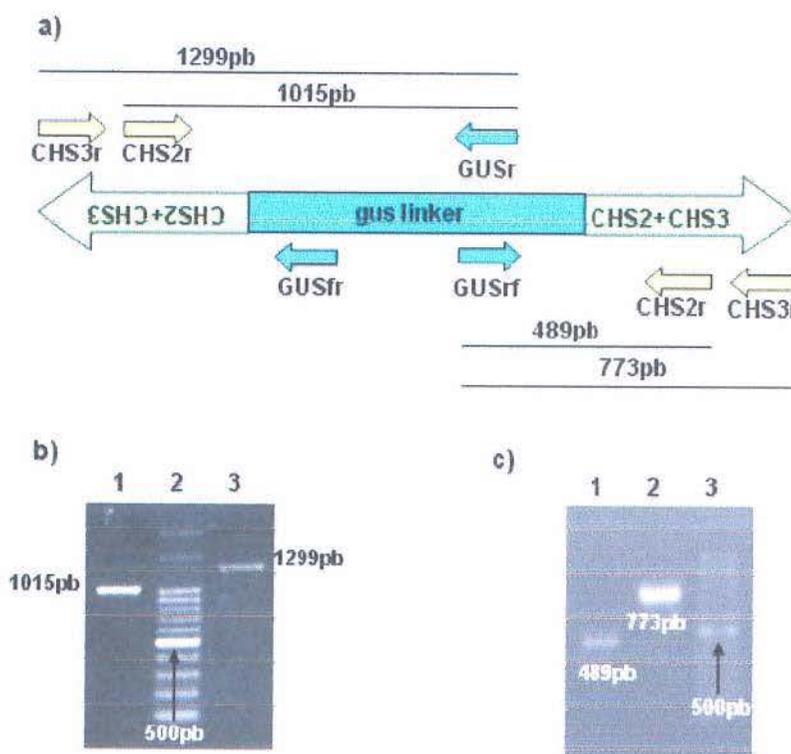


Figura 8. a) Esquema ilustrativo do fragmento recombinado no vetor pANDA e das combinações de iniciadores utilizadas assim como o tamanho de seus produtos de amplificação. **b)** Gel de agarose 1% confirmando as bandas esperadas. 1. Produto de amplificação dos iniciadores CHS2r e GUSr, 2. Padrão de DNA contendo múltiplos de 100 pb, 3. Produto de amplificação dos iniciadores CHS3r e GUSr. **c)** Gel de agarose 1,5% confirmando as bandas esperadas. 1. Produto de amplificação dos iniciadores CHS2r e GUSrf, 2. Produto de amplificação dos iniciadores CHS3r e GUSrf, 3. Padrão de DNA contendo múltiplos de 100 pb.

5. **Palavra-chave:** Neste trabalho foi obtida a construção pANDA/CHS23, derivada do vetor pANDA capaz de produzir moléculas de dsRNA em estrutura de grampo com seqüências parciais dos genes *CHS2* e *CHS3* do fungo filamentososo *M. oryzae* que codificam as enzimas de quitina sintase de classe III e I respectivamente. Essas moléculas de dsRNA, se internalizadas pelo fungo, poderão desencadear o processo de silenciamento gênico via RNAi quando presentes no citoplasma de *M. oryzae*. Estudos futuros deverão elucidar se plantas transformadas com essa construção serão resistentes a infecções causadas por este fungo. Já foi comprovado o silenciamento gênico via RNAi em *M. oryzae* transformadas com genes que produzem moléculas de dsRNA com a seqüência parcial de mRNAs endógenos (20). Nenhum estudo até agora comprovou silenciamento gênico por RNAi através de moléculas de dsRNA exogenamente obtidas pelo fungo.

5. Perspectivas

- Realizar experimentos *in vitro* com moléculas de dsRNA complementares ao mRNA que codifica a proteína GFP (green fluorescent protein) em linhagens de *M. oryzae* transformadas com genes dessa proteína para avaliar a eficiência do silenciamento por RNAi em um sistema de fungos filamentosos.
- Utilizar moléculas de dsRNA produzidas através do fragmento *CHS2+CHS3* construído neste trabalho para experimentos *in vitro* com linhagens de *M. oryzae* para avaliar o efeito do silenciamento por RNAi dos genes que codificam as quitina sintases de classe I e III na viabilidade do fungo.
- Transformar plantas de arroz (*O. sativa*) com a construção pANDA/CHS23 e avaliar a resistência das linhagens transformadas frente a uma inoculação com o fungo *M. oryzae*.

6. Referências bibliográficas.

1. INTERNATIONAL YEAR OF RICE 2004. **Rice and nutrition**. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/rice2.htm>>. Acesso em: 1º nov. 2008.
2. INTERNATIONAL YEAR OF RICE 2004. **Rice and us**. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/rice-us.htm>>. Acesso em: 1º nov. 2008.
3. INTERNATIONAL YEAR OF RICE 2004. **All about rice**. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/aboutrice.htm>>. Acesso em: 1º nov. 2008.
4. ANÚARIO BRASILEIRO DO ARROZ 2008. **Cenário**. Disponível em: <<http://www.anuarios.com.br/port/capitulo.php?idEdicao=39&intOrdem=1&idAnuario=3>>. Acesso em: 1º nov. 2008.
5. RIBOT, C. *et al.* **Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea***. Journal of Plant Physiology, v. 165, nº 1, 2008. p. 114-124.
6. COUCH, B. C.; KOHN, L. M. **A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea***. Mycologia, v. 94, nº 4, 2002. p. 683-693.
7. TALBOT, N. J. **On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea***. Annual Review of Microbiology, v. 57, 2003. p. 177-202.
8. FUNCK, G. R. D. **Manejo de Doenças do Arroz Irrigado e suas Implicações no Ambiente**. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action=meioambiente>>. Acesso em: 1º nov. 2008.
9. EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Brusone**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/pragasedoenças/brusone.htm>>. Acesso em: 1º nov. 2008.
10. LEVY, M. *et al.* **Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia**. Phytopatology, v. 83, nº 12, 1993. p. 1427-1433.
11. CARACUEL-RIOS, Z.; TALBOT, N. J. **Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea***. Current Opinion in Microbiology, v. 10, 2007. p. 339-345.

12. ZEMOLIN, C. R. *et al.* **Eficiência de fungicidas aplicados em sementes de arroz visando o controle da brusone (*Magnaporthe grisea*)**. Revista da FZVA, v. 14, nº 1, 2007. p. 81-88.
13. LATGÉ, J. P. **The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell**. Molecular Microbiology, v. 66, nº 2, 2007. p. 279-290.
14. ICHINOMIYA, M.; HORIUCHI, H.; OHTA, A. **Different functions of the class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, are revealed by repression of *chsB* expression in *Aspergillus nidulans***. Current Genetics, v. 42, nº 1, 2002. p. 51-58.
15. RONCERO, C. **The genetic complexity of chitin synthesis in fungi**. Current Genetics, v. 41, nº 6, 2002. p. 367-378.
16. TAKESHITA, N. *et al.* ***Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth**. Molecular Microbiology, v. 59, nº 5, 2006. p. 1380-1394.
17. ODENBACH, D. *et al.* **The transcription factor Con7p is a central regulator of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea***. Molecular Microbiology, v. 64, nº 2, 2007. p. 293-307.
18. VIDAL-CROS, A.; BOCCARA, M. **Identification of four chitin synthase genes in the rice blast disease agent *Magnaporthe grisea***. FEMS Microbiology Letters, v. 165, 1998, p. 103-109.
19. Hannon, G. J. **RNA interference**. Nature, v. 418, nº 6894, 2002. p. 244-251.
20. MATZKE, M. A.; BIRCHLER, J. A. **RNAi-mediated pathways in the nucleus**. Nature, v. 6, nº 1, 2005. p. 24-35.
21. KATODANI, N. *et al.* **RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae***. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 16, nº 9, 2007. p. 769-776.
22. NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. **The RNAi revolution**. Nature, v. 430, nº 6996, 2004. p. 161-164.

23. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Vol. 1, 3^a. ed. CHSL Press, 2001.