



# Simpósio de Integração Acadêmica

Inteligência Artificial: A Nova Fronteira da Ciência Brasileira

SIA UFV Virtual 2020

**UFV**  
Universidade Federal  
de Viçosa

## ISOLAMENTO DE MUTANTES PARA A NITRATO REDUTASE de *Colletotrichum lindemuthianum*, AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE E CLONAGEM DO GENE *nit1*

<sup>1</sup>ROSA, R.O.; <sup>1</sup>QUEIROZ, M.V.; <sup>1</sup>SILVA, L.L. <sup>1</sup>Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. E-mail: rafael.o.rosa@ufv.br; mvqueiro@hotmail.com; leandro.l.silva@ufv.br

**Palavras-chave:** Nitrato Redutase; Mutantes Auxotróficos; Sistema de Transformação.

**Area temática:** Genética de Micro-organismos. **Grande área:** Microbiologia. **Categoria:** Pesquisa.

### Introdução

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* é o agente causal da antracnose no feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A análise de mutantes com modificações em genes relacionados a patogenicidade é uma estratégia comumente empregada para a descoberta de proteínas essenciais para o desenvolvimento da doença. Para a aplicação da mutagênese insercional é importante o desenvolvimento de um sistema de transformação eficiente e barato. Sistemas de transformação que utilizam a complementação de mutações auxotróficas para a seleção das colônias transformadas são alternativas a seleção baseada na resistência aos antimicrobianos.

### Objetivos

Desenvolver um sistema de transformação eficiente para *C. lindemuthianum* baseado na complementação de mutantes Nit1<sup>-</sup>.

### Material e Métodos

#### Obtenção dos mutantes para o gene *nit1*

- Foram inoculados 1x10<sup>7</sup> conídios do isolado A<sub>2</sub>-2-3 (raça 89) de *C. lindemuthianum*, em placas de Petri contendo meio mínimo acrescido de clorato.
- A caracterização dos mutantes foi realizada em meio mínimo com diferentes fontes de nitrogênio, sendo elas: nitrato, nitrito, amônia e hipoxantina.

#### Teste de patogenicidade

- Folhas de feijoeiro-comum da cultivar Pérola foram inoculadas com 1x10<sup>6</sup> conídios dos mutantes Nit1<sup>-</sup> com auxílio de pincel. O isolado selvagem foi utilizado como controle.
- Após 5 dias, os sintomas da doença foram avaliados.

#### Clonagem do gene *nit1* funcional

- O DNA do isolado selvagem foi extraído e o gene *nit1* amplificado com a enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade.
- O produto da PCR foi utilizado para clonagem no vetor pZero (Invitrogen) e a reação de ligação foi utilizada na transformação de *Escherichia coli*.
- Colônias que apresentavam os plasmídeos recombinantes foram identificadas por PCR e por clivagens com diferentes enzimas de restrição.

### Resultados e Discussão

- Ao todo, 52 mutantes foram obtidos e caracterizados, sendo 33 deles mutantes para o gene *nit1*. O mutante para o gene *nit1* apresenta fenótipo diferente do selvagem quando crescido em meio mínimo com nitrato (Figura 1a).

- Os quatro mutantes Nit1<sup>-</sup> utilizados no teste de patogenicidade foram capazes de causar doença no feijoeiro-comum. Os sintomas da antracnose apresentados pelas plantas inoculadas com conídios dos mutantes e com os conídios do isolado selvagem foram semelhantes (Figura 1b-d), demonstrando que a mutação no gene *nit1* não afetou a patogenicidade.

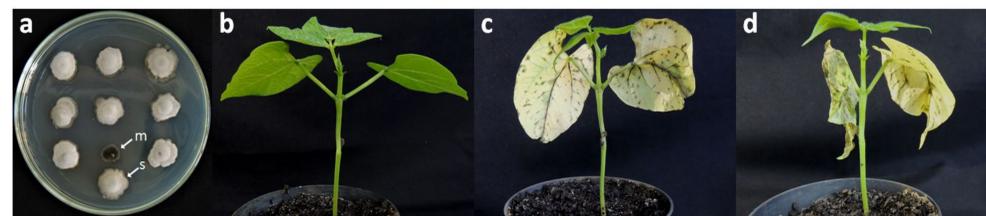


Figura 1 - Teste de patogenicidade. a) Fenótipo do fungo *C. lindemuthianum* crescido em meio mínimo com nitrato. m: mutante; s: selvagem. b) Planta de feijoeiro-comum sem inoculação. c) Planta de feijoeiro-comum inoculada com o mutante *nit1*<sup>-</sup>. d) Planta de feijoeiro-comum inoculada com o isolado selvagem.

- O gene *nit1* foi eficientemente clonado no plasmídeo pZERO (Figura 2), que passou a ser denominado pNit1Cl.

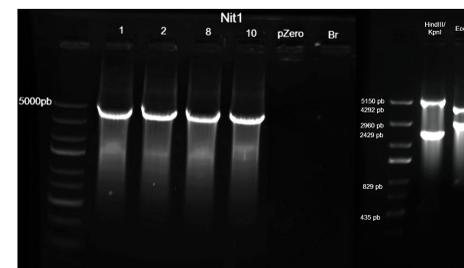


Figura 2 - Análise dos plasmídeos recombinantes. a) Confirmação da presença do gene *nit1* no plasmídeo pNit1Cl. b) Perfil de bandas do plasmídeo pNit1Cl após clivagem com as enzimas *Hind*III, *Kpn*I e *Eco*RI.

### Conclusões

A obtenção dos mutantes e do plasmídeo transportando o gene *nit1* é o primeiro passo para o estabelecimento de um sistema de transformação baseado em complementação de mutação auxotrófica. Este sistema poderá ser usado em estudos visando a inativação de genes relacionados a patogenicidade do fungo.

### Bibliografia

PEREIRA, Jorge Fernando et al. Nitrato redutase em fungos filamentosos. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 31, p. 74-85, 2003.

PEREIRA, Jorge Fernando et al. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. *Canadian journal of microbiology*, v. 50, n. 11, p. 891-900, 2004.

### Apoio Financeiro



### Agradecimentos

