

“Construção de Plasmídeos visando Modificação Genética em Fungos Filamentosos de interesse Biotecnológico”

Nicole Dalonso

Defesa:

Joinville, 18 de maio de 2018

Membros da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern (Orientadora)

Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos (UFPR)

Prof. Dr. André Luis Fachini de Souza (IFC)

Prof. Dr. Emerson Gumboski (UNIVILLE)

Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck (UNIVILLE)

Resumo

Os fungos Agaricomycetos desempenham papéis fundamentais na decomposição da matéria orgânica e equilíbrio da natureza, além de produzirem diversos produtos de interesses farmacêuticos, medicinais, cosméticos, ambientais, biotecnológicos, entre outros. As ferramentas de modificações genéticas para transformação destes organismos, visando aumento da produção de componentes com alto valor agregado, ainda são escassas e necessitam de avanços. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi desenvolver técnicas de fusionamento de fragmentos de DNA que possibilitem a montagem de cassetes para a transformação genética de fungos. Para isso foram comparadas três técnicas diferentes de fusionamento de DNA (*PCR fusion-based*, NEBuilder e *Circular polymerase extention cloning* - CPEC), e a melhor técnica foi validada em relação a montagem correta de plasmídeos. Para construção de dois plasmídeos foram empregadas estratégias de mudança de promotor do gene da glucano sintase e deleção do gene da hidrofobina de *Pleurotus ostreatus*, dando origem aos plasmídeos pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO, respectivamente.

Após fusionamento por CPEC e transformação em *Escherichia coli* houve variação de 30% (pUCHYG-HYDRO) a 85% (pUCHYG-GPDGLS) do número de colônias que continham a montagem da sequência de DNA corretas, sendo mais favorecidas as reações com menores percentuais de citosinas/guaninas (CG) e longas sobreposições nas

zonas de fusão. Os fungos selecionados para transformação foram *Pleurotus ostreatus* e *Schizophyllum commune*, com reconhecidos potenciais biotecnológicos, e os efeitos da inserção dos plasmídeos construídos foram analisados em relação à produção de polissacarídeos do tipo β - (1→3)-glucanas presentes na parede celular destes fungos. Para *P. ostreatus* os transformantes obtidos foram instáveis e não tiveram desenvolvimento maior que 2-3 mm em ambos os plasmídeos testados. Já as colônias obtidas após transformação de *S. commune* com plasmídeo pUCHYG-GPDGLS foram resistentes à higromicina e apresentaram fenótipo de hifas finas. Após análise da primeira geração com cruzamento do tipo B compatível de *S. commune* foi possível identificar colônias resistentes e sensíveis a higromicina na proporção 1:1, indicando que uma cópia do gene de resistência foi integrada ao genoma das células irmãs. Um dos cinco transformantes selecionados para estudo, o transformante T4, foi comparado em relação a sua capacidade de consumo de glicose e produção de polissacarídeos extracelulares em meio líquido mínimo. O consumo de glicose foi muito semelhante para o tipo selvagem de *S. commune* (ScW) e para o mutante (ScT4). A mutação ocasionada pela transformação de *S. commune* impediu a produção normal de exopolissacarídeos no caldo de cultivo em ScT4. Em relação aos polissacarídeos de parede celular, extraídos com água quente após cultivo submerso, foi verificada diferença de composição química quando analisados por espectroscopia de infravermelho (FT-IR), ressonância magnética nuclear (RMN), havendo predomínio de glicose (65,4%) para ScW e galactose (50,5%) para ScT4. Os rendimentos em polissacarídeos foram estatisticamente iguais em 9 dias de cultivo, quando a glicose estava praticamente depletada, e superior para T4 em 12 dias de cultivo. As alterações de composição da parede celular foram atribuídas ao fenótipo de hifas finas observado.

Palavras-chave: DNA, plasmídeos, modificação genética, fungos Agaricomycetos.