



Evento	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2015
Local	Porto Alegre - RS
Título	Construção da linhagem $Ku70$ em <i>Metarhizium anisopliae</i>
Autor	ALEXIA DE MATOS CZECZOT
Orientador	AUGUSTO SCHRANK

Construção da linhagem Δ Ku70 em *Metarhizium anisopliae*

Alexia de Matos Czczot

Orientador: Augusto Schrank

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* tem sido muito utilizado como agente de controle biológico, devido a sua capacidade de infectar diversas espécies de hospedeiros artrópodes, os quais são pragas importantes. A primeira etapa da infecção deste fungo ocorre via penetração direta através da cutícula dos hospedeiros. Durante a penetração, o fungo secreta enzimas hidrolíticas, tais como quitinases, lipases e proteases, que auxiliam no rompimento da cutícula do hospedeiro, a qual é composta majoritariamente por quitina. Essas enzimas são alvo de estudos funcionais, com o objetivo compreender sua função no processo de infecção. Uma das estratégias é, após o isolamento e caracterização de genes alvo, construir mutantes funcionais para tais genes e analisar as alterações que ocorrem. Para construir mutantes funcionais, é necessário que seja efetuada a interrupção do *locus* de interesse pela inserção de um *cassette* de inativação, que ocorre via recombinação homóloga. No entanto, como em fungos filamentosos a recombinação não homóloga é a via de reparo dominante, a geração de mutantes nulos por recombinação homóloga exibe baixa eficiência. Uma das proteínas que atua na via de recombinação não homóloga é a Ku, um heterodímero composto pelas subunidades Ku70 e Ku80, que reconhece rupturas na fita dupla do DNA, formando um complexo que recruta outras proteínas para proceder ao reparo. Sabe-se que mutantes na via de recombinação não homóloga aumentam a frequência de recombinação homóloga. Portanto, o objetivo desse trabalho é obter mutantes para o gene *ku70* a fim de aumentar a taxa de recombinação homóloga para que, posteriormente, possam ser construídos com maior eficiência mutantes funcionais para genes alvo em *M. anisopliae*. Inicialmente foi construído um *cassette* de deleção para o gene *ku70*, através da amplificação de regiões de 1.000 pares de bases a montante e a jusante da região codificadora do gene *ku70*. Esses produtos amplificados foram fusionados a marca de resistência para o antibiótico nourseotricina (gene *nat*), sendo o *cassette* de deleção clonado no vetor de entrada pCR-2.1-TOPO, e subclonado no vetor binário pPZP201BK. Após essa etapa, células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* foram transformadas com o vetor pPZP:: Δ Ku70::*nat* e, posteriormente, utilizadas na agrotransformação de *M. anisopliae*. A busca pelo mutante de *M. anisopliae*, contendo o *locus* do gene *ku70* interrompido foi realizada pela extração de DNA e a análise por PCR identificou 4 potenciais mutantes. Após a confirmação da obtenção dos mutantes, serão realizados diversos testes fenotípicos e bioensaios para avaliar se a deleção de *ku70* afeta as características do fungo e o seu processo de infecção.

Financiamento: FAPERGS, CNPq, CAPES.