

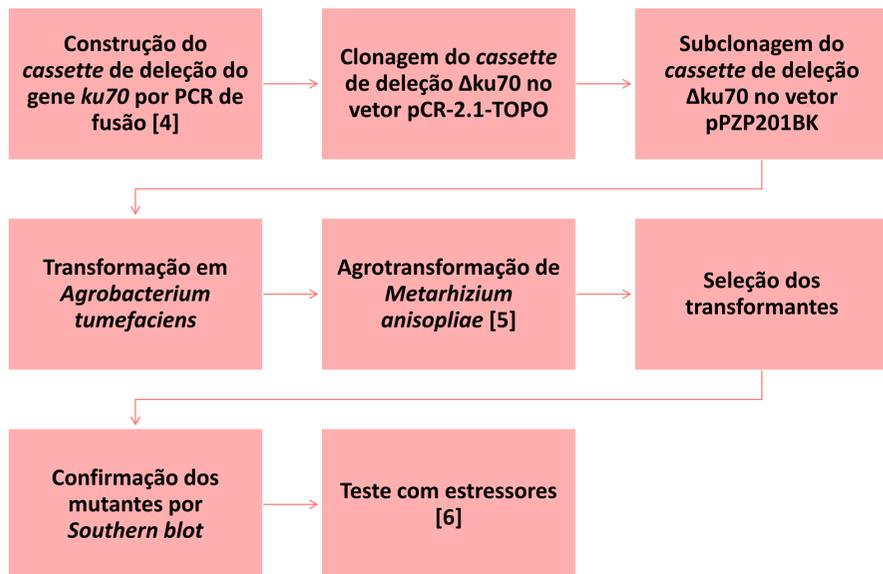
## INTRODUÇÃO

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 praga. A primeira etapa da infecção deste fungo ocorre via penetração direta através da cutícula dos hospedeiros. Durante essa fase, o fungo secreta enzimas hidrolíticas que auxiliam no rompimento da cutícula do hospedeiro. Essas enzimas são alvo de estudos funcionais, com o objetivo compreender sua função no processo de infecção. Uma das estratégias para estudar a função de genes é, após o isolamento e caracterização destes, construir mutantes funcionais para tais genes e analisar as alterações resultantes. Essas metodologias estão baseadas na interrupção de um determinado *locus* alvo, pela inserção de um fragmento de DNA que interrompe a expressão do gene, sendo esse processo realizado via recombinação homóloga [1]. No entanto, como em fungos filamentosos a recombinação não homóloga é a via de reparo dominante, a geração de mutantes nulos por recombinação homóloga exige baixa eficiência [2]. Uma das proteínas que atua na via de recombinação não homóloga é o heterodímero 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 para a via de recombinação não homóloga aumentam a frequência de recombinação homóloga. Dessa forma, deleções de Ku70 ou Ku80 diminuem ou inibem a recombinação não homóloga, favorecendo eventos de recombinação homóloga [3].

## OBJETIVO

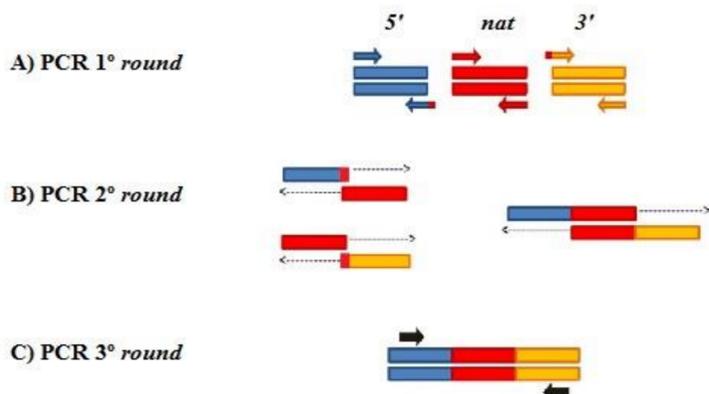
O objetivo desse trabalho é construir linhagens mutantes para o gene *ku70* a fim de aumentar a taxa de recombinação homóloga para que, posteriormente, possam ser construídos com maior eficiência mutantes funcionais para genes alvo em *M. anisopliae*.

## METODOLOGIA



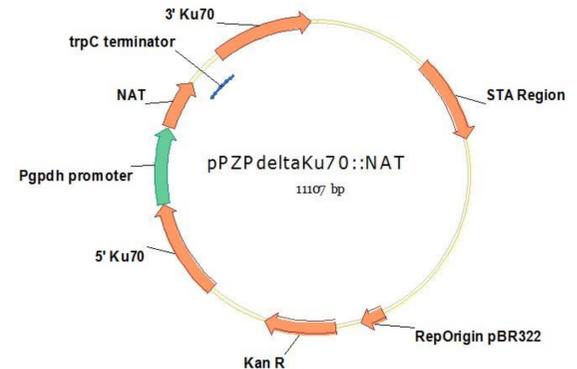
## RESULTADOS

- Construção do *cassete* de deleção.



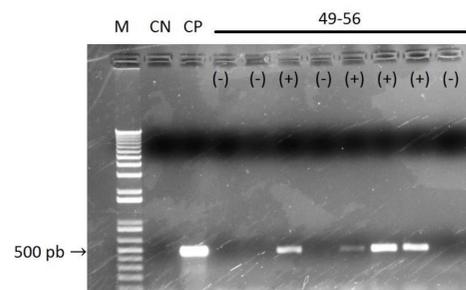
**Fig. 1** Representação esquemática das etapas de construção do *cassete* de deleção do gene *ku70*. Através da reação de fusão, os fragmentos de DNA da região 5', 3' do gene *ku70* (em azul e amarelo, respectivamente) e daquele que contém a marca de resistência *nat* (em vermelho), o qual confere resistência a nourseotricina, foram fusionados. (A) PCR 1º round: amplificação das regiões 5' e 3' do gene de interesse e da marca de resistência *nat*. (B) PCR 2º round: fusão dos três fragmentos. (C) PCR 3º round: amplificação da construção fusionada, utilizando os *primers nested* (setas pretas).

- Clonagem do *cassete* de deleção  $\Delta$ Ku70 e obtenção do plasmídeo pPZP:: $\Delta$ Ku70::nat.



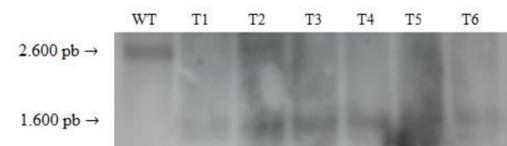
**Fig. 2** Representação da construção do plasmídeo pPZP:: $\Delta$ Ku70::nat, vetor para construção dos mutantes.

- Obtenção de 385 transformantes com inserção do *cassete* de deleção, selecionados por PCR negativa.



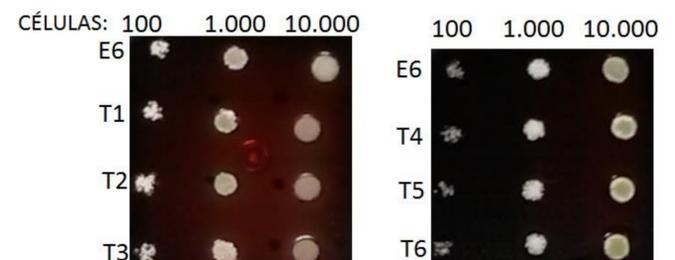
**Fig. 3** Screening dos transformantes obtidos a partir da agrotransformação de *M. anisopliae* com plasmídeo pPZP:: $\Delta$ Ku70::nat. Representação de oito transformantes. M= marcador 1 Kb plus DNA ladder; CP= controle positivo (DNA da linhagem E6 de *M. anisopliae*) com aproximadamente 500 pb; CN= controle negativo; (49-56)= transformantes testados pela PCR com os *primers* KU70int\_1F e KU70int\_1R; (-)= ausência da amplificação de 500 pb (possível recombinação homóloga).

- Obtenção de seis mutantes com o gene *ku70* interrompido, confirmados por Southern blot.



**Fig. 4** Confirmação dos transformantes por Southern blot. WT= selvagem (linhagem E6 de *M. anisopliae*) com hibridização em 2.600 pb, T1-T6= mutantes com o *locus* do gene *ku70* interrompido com hibridização em 1.600 pb.

- Teste com estressores a fim de avaliar se a sensibilidade de *M. anisopliae* a estes compostos é afetada não indicou diferença fenotípica visível entre as linhagens analisadas.



**Fig. 5** Teste com estressor Congo Red incubado em Meio de Cove acrescido de 2% de soluções de sais, 0,04% de elementos traços e 450 µg/ml de Congo Red a 28 °C durante 7 dias. E6 = linhagem selvagem, T1-T6= mutantes com o *locus* do gene *ku70* interrompido.

## PERSPECTIVAS

- Comparar a virulência dos mutantes com a linhagem selvagem por bioensaio com *Dysdercus peruvianus* para avaliar se a taxa de mortalidade deste hospedeiro é afetada.
- Avaliar o aumento da taxa de recombinação homóloga através da construção do mutante  $\Delta$ ade2 de *M. anisopliae*.
- Avaliar sensibilidade dos mutantes a mutagênicos para testar se a capacidade de reparo do DNA é afetada.
- Induzir a formação de apressório e blastosporo nos mutantes para analisar se a formação desses tipos celulares é afetada.

## REFERÊNCIAS

- Krappmann, S. (2007) Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. *21*(1), 25–29.
- He, Y. et al. Ku70 and ku80 null mutants improve the gene targeting frequency in *Monascus ruber* M7. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 97, n. 11, p. 4965-76, Jun 2013. ISSN 1432-0614.
- Carvalho, N. D. et al. Expanding the ku70 toolbox for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, n. 4, p. 1463-73, Jul 2010. ISSN 1432-0
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y., & Sczzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. In *Fungal Genet Biol* (Vol. 41, pp. 973-981). United States.
- Staats, C. C., Junges, A., Fitarelli, M., Furlaneto, M. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2007) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology Biotechnology* 76(4), 945-950.
- DUBEY, M. K. et al. Disruption of the Eng18B ENGase gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* affects growth, conidiation and antagonistic ability. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e36152, 2012. ISSN 1932-6203.

Apoio: