

Sessão 33

Genética Molecular I

353

TRANSFORMAÇÃO DO ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae* PARA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA PR1A. Guimarães, A.P.; Franceschini, M.; Vainstein, M.; Schrank, A.. (Departamento de biologia molecular, Centro de biotecnologia, UFRGS).

O controle biológico utilizando o fungo *M. anisopliae* é uma alternativa viável para o combate de carrapatos. O maior entrave para a sua utilização como biocontrolador é o maior tempo necessário entre a aplicação e a morte do hospedeiro quando comparado a pesticidas químicos. Uma alternativa, com grande potencial de êxito, é a introdução de genes específicos, altamente expressos em condições de infectividade, visando acelerar o processo de infecção. ST. LEGER *et al.* (1996), durante a caracterização de uma protease de *M. anisopliae*, mostrou que a adição de cópias múltiplas de seu gene sob o controle de um promotor constitutivo aumenta a virulência dos transformantes, confirmando que as proteases do tipo subtilisina podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de biopesticidas. O gene que codifica a protease PR1A foi amplificado por PCR e parcialmente seqüenciado. Um clone de cDNA correspondendo ao gene *pr1A* foi clonado no vetor para expressão em fungos, o pAN52.1BamHI. A construção pAN52.1Bpr1A foi co-transformada com o vetor pBT6, com marca de seleção para resistência a benomil, na linhagem E₆S₁ de *M. anisopliae*. Foi obtida uma frequência de transformação de 351 transformantes por µg de DNA, usando o método de biolística para transformação. A estabilidade mitótica obtida foi de 30%. Dos 40% dos transformantes estáveis já analisados, 12% apresentaram um aumento estatisticamente significativo na expressão da protease PR1A em comparação com a linhagem de *M. anisopliae* não transformada. A confirmação da co-transformação nestes transformantes foi realizada através de uma PCR com *primers* específicos para o plasmídeo pAN52.1BamHI. Um *Southern* confirmou que o fragmento amplificado correspondia ao gene *pr1A*. (PADCT III, CNPq, Fapergs).