

Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* via biobalística

Bastos, L. S^{1,3}; Castros, E. C^{1,3}; Cardoso M. A^{2,3}; Miller, R. G. N^{1,3}; Fernandes, L^{2,4}.

¹Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brasil.

³Laboratório de Interação Planta-Praga, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brasil.

⁴Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brasil.

Resumo: O fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) é o agente causal da murcha por *Fusarium*, uma doença de grande impacto na produção global de banana (*Musa* spp). Diferentes raças de *Foc* são capazes de infectar grupos distintos de cultivares de banana. A raça 1 (R1) é patogênica para cultivares do subgrupo Gros Michel (AAA) e de bananas de sobremesa (AAB), como Prata e Silk. A raça 2 infecta cultivares do grupo Bluggoe (ABB). A raça 4 de *Foc* é dividida em raça tropical 4 (TR4), que é patogênica a todas as cultivares, incluindo o subgrupo Cavendish (AAA), e a raça subtropical 4 (STR4), que é capaz de infectar Cavendish apenas em condições de clima subtropical. No Brasil, há a presença de *Foc* STR4 em diversas regiões produtoras, gerando risco de produção e perda de áreas produtivas devido à persistência do patógeno por longos períodos. Estudos sobre a interação *Musa-Foc* vêm sendo realizados há anos, a fim de elucidar os mecanismos de defesa vegetal e de virulência do patógeno. Ferramentas para a edição genica do patógeno são essenciais para entender a biologia da infecção nessa interação. O objetivo deste trabalho é utilizar a biobalística como método de transformação e avaliar sua eficiência na inserção de genes em *Foc* STR4 (isolado 218A). Para isso, foram utilizados 1×10^9 de conídios de 218A para o bombardeamento. O plasmídeo doador possui o gene de resistência à higromicina B (*hygR*) como marcador de seleção e o gene de uma proteína verde fluorescente (*gGFP*). A concentração mínima inibitória para higromicina B foi determinada utilizando diferentes concentrações de conídios (10^3 , 10^5 , 10^7 mL) e quatro doses do antibiótico (0, 25, 50, 75, 100 μ g/mL). A concentração mínima inibitória para Higromicina B foi de 100 μ g/mL. A transformação via biobalística utilizou o equipamento PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad), com a distância de 6 cm entre o local de lançamento das partículas e os conídios. O vácuo aplicado foi de 26 mmHg e o disco de ruptura foi pressurizado com 1350 psi de Hélio. As

partículas de tungstênio carregavam aproximadamente 1250 ng do DNA de interesse. Após o bombardeamento, os conídios foram recuperados após 6 e 16 horas em meio seletivo contendo higromicina B. As colônias foram isoladas entre sete e 14 dias após o bombardeamento. Todos os clones apresentaram estabilidade no gene de *hygR*, mantendo-se após múltiplas repicagens em 100% dos isolados. A taxa de clones expressando GFP foi de aproximadamente 30%. Seis clones GFP positivo foram inoculados em Prata-anã, uma cultivar suscetível a STR4, com um clone posteriormente recuperado do interior das raízes utilizando meio seletivo Komada com modificações. A biobalística mostrou-se eficiente para a transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* STR4, gerando transformantes com a presença de GFP e demonstrando sua eficiência para manipulação genica de *Foc*. O isolado de STR4 GFP positivo permite agora que mais estudos sejam realizados com o intuito de entender os mecanismos da interação *Musa-Foc*, como microscopia confocal a fim de observar o processo de infecção.

Palavras-chave: GFP; Banana; Bombardeamento; Transformação genética.