

Transformação genética e detecção molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* como ferramenta para estudos funcionais da murcha de *Fusarium* em bananeiras

Autores:

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

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

²Laboratório de Interação Planta-Praga, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brasil.

³Laboratório 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. *ubense* (Foc) é o agente causal da doença vascular murcha de *Fusarium*, impactando a produção de bananas (*Musa* spp.) em diversos continentes. O patógeno é dividido em diferentes raças fisiológicas com distintos espectros de cultivares hospedeiros. No Brasil as raças predominantes são a raça 1 (R1) que é patogênica ao subgrupo Gros Michel (AAA) e de bananas de sobremesa (AAB), como Prata, e a raça subtropical 4 (STR4) que é capaz de infectar todas as cultivares, até mesmo aquelas que apresentam resistência a R1 como o subgrupo Cavendish (AAA). Diante do risco do avanço do patógeno e visando entender a biológica do seu parasitismo, o presente estudo visou o desenvolvimento e validação de um sistema de transformação genética via biobalística para o isolado 218A de *Foc* STR4, além do desenvolvimento de um sistema de detecção molecular. Para o bombardeamento foram utilizados 3×10^9 conídios e o plasmídeo doador contendo o gene de resistência à higromicina B (*hygR*) e o gene de uma proteína verde fluorescente (*gGFP*). A concentração mínima inibitória para Higromicina B determinada foi de 100 µg/mL. Utilizou o equipamento PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad), com 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 1250 ng do DNA de interesse. Utilizou-se seis clones para o estudo, a estabilidade do gene *hygR* foi avaliada por múltiplas transferências em meio seletivo, já para o *gGFP* a confirmação foi feita através de fluorescência via microscópio de fluorescência. Para confirmação molecular da inserção de *gGFP*, o DNA genômico foi extraído de micélio cultivado em PDB por 7 dias a 28°C, utilizando o método de Fenol – Clorofórmio. Para confirmar a inserção do gene *gGFP* no genoma dos clones, foram desenhados dois conjuntos de primers baseados na sequência do gene *GFP* presente no plasmídeo pCN50. Ambos os pares foram desenhados com temperatura de anelamento a 60°C, o conjunto eGFP_1 com um amplicon de 405 bp e o eGFP_2 com 639 bp. Os primers foram desenhados utilizando Primer Quest Tool – IDT e sua especificidade foi avaliada utilizando varredura em organismos eucariotos no NCBI Primer-BLAST. Para PCR utilizou-se MyTaq, seguindo os parâmetros: desnaturação inicial e *hot start* a 94°C

por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 45s, 60°C por 1 min, 72°C por 45s, alongação final por 72°C a 5 minutos. Apenas o conjunto eGFP_2 mostrou especificidade nos transformados e não amplificou no controle negativo. O desenvolvimento do isolado de STR4 fluorescente representa um avanço para estudos funcionais na interação *Musa-Fusarium* permitindo o monitoramento da colonização fúngica por microscopia confocal. Além disso, o sistema de transformação poderá ser aplicado em estudos funcionais contribuindo para a elucidação de genes de virulência e o desenvolvimento de estratégias de resistência durável em bananeiras, com benefícios diretos à produção e à sustentabilidade do cultivo.

Palavras-chave: *Musa*; Murcha de *Fusarium*; Transformação genética; Edição gênica.