

Transformação de *Trichoderma harzianum* BRM27158 por *Agrobacterium tumefaciens* e caracterização de uma biblioteca de transformantes

Mariana Santos Tamietti¹, Gláucia Emy Okida Midorikawa², Paula Marcela Duque Jaramillo³, Débora Costa da Cunha⁴, Joana Flor Rattes Nunes⁵, Léia Cecília de Lima Fávoro⁶, Eliane Ferreira Noronha⁷

Resumo

O controle biológico de pragas e doenças de plantas tem se mostrado uma alternativa promissora para a diminuição do uso intensivo de pesticidas e fungicidas. Nesse contexto, fungos do gênero *Trichoderma* se destacam como um dos organismos mais utilizados para o controle de fitopatógenos, sendo agentes antagonistas em produtos comerciais para biocontrole. Neste trabalho, buscou-se identificar e caracterizar genes de *Trichoderma harzianum* BRM27158 envolvidos na interação com fungos fitopatogênicos. Para tanto, foi construída uma biblioteca de transformantes por meio de transformação mediada por *A. tumefaciens* com o vetor binário pFAT-GFP. Este método permite a ocorrência de inserções aleatórias do T-DNA (contendo os genes *hph* como marcador seletivo e *gfp* como repórter) no genoma do fungo. A biblioteca foi purificada por cultivo monospórico e as linhagens foram avaliadas quanto à estabilidade genética por até 6 gerações. Em seguida, os transformantes foram caracterizados quanto à produção de proteases (enzimas essenciais na atividade antagonista de *Trichoderma* spp.) em comparação com a cepa parental, em testes em cultivo submerso. A confirmação da transformação foi realizada por PCR com primers específicos para os genes *hph* e *gfp*. As linhagens selecionadas tiveram as regiões flanqueadoras do T-DNA amplificadas por TAIL-PCR, clonadas, sequenciadas e avaliadas contra a sequência genômica anotada da cepa BRM27158. Foram obtidos 168 transformantes resistentes à higromicina. Todos os transformantes avaliados permaneceram estáveis após 6 gerações de cultivo na ausência do agente seletivo (higromicina). A análise da região flanqueadora da borda esquerda do T-DNA de um dos transformantes revelou que a inserção ocorreu em um gene que codifica uma peptídeo sintase não ribossômica (NRPS), a qual é envolvida na produção de metabólitos secundários com atividade biológica. No entanto, este transformante não apresentou diferenças relevantes quanto à produção de proteases em comparação com a cepa parental. A análise do metaboloma desse transformante em comparação com a cepa parental poderá futuramente auxiliar a identificação do metabólito peptídico produzido pela NRPS nocauteada. Os resultados em conjunto mostram que a biblioteca obtida e caracterizada constitui uma rica fonte para estudos de caracterização funcional de genes envolvidos na interação com patógenos e ainda desconhecidos para *T. harzianum*.

Auxílio Financeiro: Capes e CNPq.

Palavras-chave: controle biológico. transformação mediada por *Agrobacterium*. *Trichoderma*. NRPS.

¹ Bióloga, mestranda em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, marianasantostamietti@gmail.com.

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, colaboradora da Embrapa Agroenergia, glauciaemy@gmail.com.

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, jaramillo526@gmail.com.

⁴ Bióloga, mestranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, debora.costa@gmail.com.

⁵ Bióloga, mestranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, jorattes@gmail.com.

⁶ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br.

⁷ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, professora da Universidade de Brasília, elinoronha@gmail.com.