

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* do fungo celulolítico *Trichoderma harzianum* CFAM422 e obtenção de uma biblioteca de transformantes

Alyssa M. F. Shimizu^{1,2*}; Paula M. D. Jaramillo²; Gláucia E. O. Midorikawa²; Ayla. S. Silva³; Elba P. S. Bon⁴; Léia C. L. Fávaro²

Introdução

Fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidos por sua capacidade de produzir enzimas para aplicação no processo de conversão enzimática de biomassa vegetal. No entanto, esses microrganismos podem ter limitações na produção de uma ou outra enzima, limitando a eficiência do processo de hidrólise, que é possível devido à atuação sinérgica das celulasas e hemicelulasas (KUMAR et al., 2008). Torna-se assim necessário utilizar técnicas de melhoramento genético que aumentem a produção das enzimas utilizadas no processo. Souza et al. (2011) selecionaram a linhagem *Trichoderma* sp. CFAM-422, dentre várias linhagens isoladas na Amazônia, como melhor produtora de FPase, β -glicosidase e xilanase em comparação com linhagens industriais. Na Embrapa Agroenergia a linhagem CFAM422 (identificada como *T. harzianum* por métodos moleculares) foi submetida a um programa de melhoramento convencional, visando alcançar maiores níveis de produção de enzimas celulolíticas. Como parte do programa de melhoramento genético, a adaptação de protocolos de transformação genética visando à manipulação de genes de interesse é essencial. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de transformação mediada por *A. tumefaciens* para *T. harzianum* CFAM-422 e obter uma biblioteca de transformantes visando à identificação de genes envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas.

Métodos

O protocolo utilizado para transformação por *A. tumefaciens* foi realizado conforme Fávaro (2009), com modificações. Células de *A. tumefaciens* EHA105 carregando o vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003) foram crescidas em YEP contendo espectinomicina e

1 Universidade de Brasília (UnB), Brasília/DF, Brasil

2 Embrapa Agroenergia, Brasília/DF, Brasil

3 Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Rio de Janeiro/RJ, Brasil

4 Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brasil

*alyssa.maria@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

rifampicina (100 µg/mL). Esta cultura foi diluída para uma densidade ótica de 0,15_(660 nm) em meio de indução líquido suplementado com acetoseringona (200 mM) e incubada até atingir densidade ótica de 0,6_(600 nm). Esta suspensão de células foi misturada (1:1) com uma suspensão de conídios (10⁶ conídios/mL). Alíquotas de 200 µL desta mistura foram espalhadas sobre discos de membrana de nylon (0,45 µm) em meio de indução sólido suplementado com 200 mM de acetoseringona. Placas de co-cultivo sem acetoseringona foram utilizadas como controle. Após co-cultivo a 25°C por 48h, as membranas foram transferidas para PDA contendo higromicina B (100 µg/mL), cefoxitina sódica (200 µg/mL) e Triton X-100 (0,1%). As placas foram incubadas por 7-20 dias a 28°C, até o surgimento de colônias resistentes à higromicina B. Os transformantes obtidos foram purificados por meio de três repiques sucessivos em meio seletivo e os que permaneceram resistentes à higromicina B foram novamente purificados para obtenção de culturas monospóricas, e então foram preservados em duplicata em água destilada (método Castellani). A estabilidade genética de 20 transformantes monospóricos escolhidos aleatoriamente foi avaliada por meio de 10 repiques sucessivos em PDA sem o agente seletivo. A confirmação da transformação foi realizada por PCR, por meio da amplificação do gene que confere resistência a higromicina B. A amplificação das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA foi realizada pela técnica TAIL-PCR.

Resultados e Conclusões

Os resultados mostraram que transformantes resistentes à higromicina B e expressando a proteína verde fluorescente GFP podem ser facilmente obtidos utilizando conídios não germinados como material inicial. Os transformantes foram obtidos quando acetoseringona estava presente durante o co-cultivo. Na ausência de acetoseringona, nenhum transformante foi recuperado. Um total de 618 transformantes foi obtido, sendo que o número de transformantes por placa variou de 1 a 20, em um total de 164 placas de meio seletivo que foram utilizadas no experimento. A presença de Triton X-100 no meio seletivo facilitou a obtenção de colônias de tamanho reduzido de modo a evitar a sobreposição entre transformantes crescendo em uma mesma placa.

Os testes de estabilidade genética com 20 transformantes revelaram que 45% mantiveram a capacidade de crescer na presença de higromicina B após 10 repicagens sucessivas em meio PDA sem adição deste agente seletivo. A transformação foi confirmada por PCR para 15 transformantes, a partir da amplificação de um fragmento de 600 pb, correspondente ao gene de resistência à higromicina B. Foi possível obter produtos de amplificação das regiões que flanqueiam o T-DNA dos transformantes de número 129, 236 e 250. Neste trabalho foi possível adaptar um protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium* para *T. harzianum* CFAM422 e obter, pela primeira vez, uma biblioteca

de transformantes que poderá ser caracterizada para descoberta de genes de interesse envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas.

Apoio Financeiro

CNPq e Embrapa

Referências

FAVARO, L. C. de L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

FITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, New York, v. 107, p. 803-810, parte 7, 2003.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

SOUZA, M. F.; GONÇALVES, H. R. A.; FERNANDES, O. C. C.; BOM, E. P. S.; SILVA, A. S. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos filamentosos isolados da Amazônia: seleção de uma linhagem promissora. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 18., 2011, Caxias do Sul. [Anais...]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011.