

***Trichoderma harzianum* GENETICAMENTE MODIFICADO COMO ESTRATÉGIA DE ESTUDO DO BIOCONTROLE EM PRESENÇA DE HERBICIDA**

NASCENTE, Eduardo de Paula¹; VIEIRA, Pabline Marinho²; BERBERT, Pedro Souza³; ULHOA, Cirano José⁴, ARAGÃO, Francisco José Lima³

¹ Estudante de Iniciação Científica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Urutaí - GO. Eduardodepaula100@gmail.com; ² Orientadora – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano –Laboratório de Biotecnologia- Câmpus Urutaí - GO. pablinebio@gmail.com.

³ Colaboradores - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Laboratório de Engenharia Genética;

⁴ Universidade Federal de Goiás-Laboratório de Biologia Molecular e Enzimologia

RESUMO: *Trichoderma harzianum* é um microrganismo utilizado em biopesticidas e biofertilizantes comerciais para o controle biológico de fungos fitopatogênicos. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade de biocontrole realizado por *Trichoderma harzianum* em presença glifosinato de amônio, herbicida amplamente utilizado em práticas agrícolas. Para isso, foi realizada a transformação genética de *T. harzianum* com o gene de tolerância ao herbicida glifosinato de amônio (*bar*). Transformantes e *T. harzianum* selvagem foram avaliados quanto ao crescimento e atividade de biocontrole de *Fusarium moniliforme* em diferentes condições de crescimento, demonstrando efeitos tóxicos desse herbicida ao fungos selvagem e sua atividade antagonista. A estratégia representa uma perspectiva biotecnológica para a prospecção de genes de interesse para a transgenia de plantas, bem como, seleção de linhagens de *Trichoderma* mais eficientes no controle biológico de fitopatógenos.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*. Biocontrole. Biotecnologia. Genética. Herbicida.

INTRODUÇÃO

Trichoderma harzianum é um microrganismo de controle biológico eficaz contra patógenos de importância epidemiológica (TOURNAS, 2005). Ao longo dos últimos anos, a transformação genética tem sido uma ferramenta indispensável para a análise funcional de genes de interesse biotecnológico. Nesse sentido, as propostas úteis são a deleção (*knock out*) ou a superexpressão da transcrição do gene alvo (MASSART & JIJAKLI, 2007).

A principal estratégia empregada na prospecção de genes em espécies de *Trichoderma* com potencial biotecnológico é a transformação genética. Através das técnicas de deleção, silenciamento e superexpressão é possível identificar genes marcadores para o biocontrole, selecionar linhagens mais eficazes na agricultura, além de permitir a análise funcional de genes de *Trichoderma* com aplicações agrícolas e industriais (HERMOSA *et al.*, 2011; FRISCHMANN *et al.*, 2013; SCHUSTER *et al.*, 2012).

O objetivo deste trabalho foi de realizar a transformação genética de *T. harzianum* com o gene de tolerância a glifosinato de amônio, e

avaliar os biocontrole dos transformantes em presença de herbicida.

MATERIAL E MÉTODOS

Trichoderma harzianum ALL 42 da coleção do Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB) e o fungo fitopatogênico *Fusarium sp* (EMBRAPA-ARROZ/FEIJÃO) foram mantidos com repiques em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e também em meio BDA.

A construção do vetor do gene de tolerância ao herbicida glifosinato de amônio (*bar*), bem como, a transformação de *T. harzianum* foram realizados no Laboratório de Engenharia Genética aplicada à agricultura tropical da EMBRAPA Biotecnologia-Cenargen. Para a transformação de *T. harzianum* (ALL42) por bombardeamento, micropartículas de tungstênio M5 contendo 5 µg do vetor de superexpressão, foram preparadas de acordo com Aragão *et al.* (2002). Cada transformante obtido foi isolado em uma placa contendo glifosinato de amônio.

Os transformantes de *T. harzianum* foram avaliados quanto a alterações fenotípicas, bem como, à atividade antagonista de *Fusarium*

moniliforma. Tanto os testes de crescimento quanto de antagonismo foram testados também em meio contendo o herbicida glifosinato de amônio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 9 transformantes de *Trichoderma harzianum* via biobalística, sendo que quatro foram selecionados para os bioensaios (T1, T2, T3 e T4).



Figura 1 - Bioensaios com *Trichoderma harzianum* selvagem e transformantes (T1, T2, T3 e T4). Linha 1: crescimento em meio BDA. Linha 2: crescimento em meio BDA e glifosinato de amônio, Linha 3: confronto com *Fusarium* em meio BDA. Linha 4: confronto com *Fusarium* em meio BDA com glifosinato de amônio.

Foi possível observar que o glifosinato de amônio afetou o crescimento de *T. harzianum*, bem como, sua atividade de biocontrole (Fig. 1, linhas 2 e 3). Já foi relatado que os herbicidas podem interagir com fungos antagonistas, afetando seu desempenho (PEIXOTO et al., 2010)

Nossos resultados são similares aos estudos realizados por Reis et al. (2013), em que foi observado que herbicidas afetam o crescimento e esporulação de isolados de *Trichoderma* sp.

Transformantes em meio contendo com o herbicida foram tolerantes ao glifosinato de amônio devido a presença do gene de resistência (*bar*) no seu vetor de expressão. E ainda, foram mantidas as atividades de biocontrole de *Fusarium moniliforme*. Sendo assim, essa representa uma nova perspectiva biotecnológica para estudos da ação de herbicidas em microrganismos de controle biológico.

CONCLUSÃO

A estratégia de estudo com transformantes superexpressando o gene de tolerância ao

herbicida glifosinato de amônio representa uma perspectiva biotecnológica para a prospecção de genes de interesse para a transgenia de plantas, bem como, seleção de linhagens de *Trichoderma* sp. mais eficientes no controle biológico de fitopatógenos.

AGRADECIMENTOS

Laboratório de Engenharia Genética-Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, CNPq, CAPES e Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, F.; SANTOS, M.; MORAIS, L.; ROMANO, E. Metodologias para Transformação Genética de Plantas-Modelo. **Circular técnica**, vol. 15, p.1–5, 2002.
- FRISCHMANN, A.; NEUDL, S.; BONAZZA, K. Self-assembly at Air / Water Interfaces and Carbohydrate Binding Properties of the Small Secreted Protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. **Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4278–4287, 2013.
- HERMOSA, R.; BOTELLA, L.; KECK, E.; JIMENEZ, J. A.; MONTERO-BARRIENTOS, M.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A.; MONTE, E.; NICOLÁS, C. The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 11, p. 1295–302, 2011.
- MASSART, S.; JIJAKLI, H. M.; Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 2, p. 29–41, 2007.
- PEIXOTO, M. F. S. P.; BORGES, V. P.; BORGES, V. P.; PEIXOTO, C. P. Ação do trifluralin na micorrização e crescimento de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea*). **Planta daninha**, vol.28, n.3, pp. 609-614, 2010.
- REIS, M. R.; LEÃO, E. U.; SANTOS, G. R.; SARMENTO-BRUM, R. B. C.; GONÇALVES, C. G.; CARDON, C. H.; SILVA, D. B.; Impacto de herbicidas em isolados de *Trichoderma* spp. **Planta Daninha**, v.31, n.2, p.419-426, 2013.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–99, 2010.
- TOURNAS, V. H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Critical reviews in microbiology**, v. 31, n. 1, p. 33–44, 2005.