

OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO UMA HIDROLASE DE *Trichoderma harzianum*

VIANA, Karine Maria de Sousa¹; VIANA, Aline Maria de Sousa²; VIEIRA, Pabline Marinho³; ARAGÃO, Francisco José Lima⁴

¹ Estudante de Iniciação Científica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Urutaí - GO. karineviana@hotmail.com; ² Estudante de Iniciação Científica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Urutaí - GO. ³ Orientadora – Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Urutaí - GO. pablinebio@gmail.com; ⁴ Colaborador – EMBRAPA-Biotecnologia – Brasília.

RESUMO: *Trichoderma harzianum* é um biofungicida utilizado para o controle biológico de fitopatógenos. Estudos com esse microrganismo identificaram o gene codificador uma hidrolase durante o biontrole de fitopatógenos de importância econômica. Nesse trabalho foi realizada a transformação genética de *Nicotiana tabacum* com essa hidrolase de *T. harzianum* e avaliado o potencial biotecnológico desse gene para a tolerância de plantas a fitopatógenos. Foram obtidas 110 linhagens transgênicas, sendo que quinze progênies foram avaliadas quanto a tolerância a *Sclerotinia sclerotiorum*. Foi observado que linhagens de tabaco transformadas com esse gene apresentaram desenvolvimento e morfologia inalteradas e, ainda, maior tolerância ao fitopatógeno quando comparado ao tabaco selvagem. Nossos resultados indicam o elevado potencial de hidrolase de *Trichoderma harzianum* para a transgenia de plantas de valor comercial.

Palavras-chave: Transformação genética. Controle biológico. *Sclerotinia sclerotiorum*.

INTRODUÇÃO

Plantas geneticamente modificadas surgiram como propostas úteis para a redução de pragas que interferem na produção agrícola e aumentar de resistência de plantas a fitopatógenos. Entretanto, para o estudo de aplicabilidade de genes em plantas com interesse econômico, a expressão prévia em plantas modelo surge como excelente alternativa.

Atualmente, são conhecidos trabalhos de transformação de plantas utilizando genes de *Trichoderma*, sendo que foi demonstrado que estas apresentaram resistência a estresses biótico e abiótico (Montero-Barrientos *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2011). Além disso, proteínas de reconhecido interesse biotecnológico de *Trichoderma* já são produzidas com sucesso para aplicações agrícolas e industriais (Lorito *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2002). Assim, a expressão de proteínas de *Trichoderma* em plantas representa excelente estratégia biotecnológica para diminuir o custo de produção de proteínas quando comparada as alternativas atuais e, ainda, identifica genes de interesse biotecnológico para a transgenia de plantas de interesse econômico.

Recentemente, nosso grupo identificou genes de *Trichoderma harzianum* que estão relacionados com o biocontrole de fitopatógenos de feijão (Vieira *et al.*, 2013). Neste foi demonstrado que uma hidrolase (hidrolase 76) representa potencial biotecnológico para a obtenção de plantas resistentes a fatores bióticos. Sendo assim, neste trabalho foram transformadas plantas de tabaco com uma hidrolase de *Trichoderma harzianum* e as plantas avaliadas quanto à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Construção do vetor e transformação genética de tabaco (Nicotiana tabacum) via Agrobacterium tumefaciens

A sequência do gene identificado em *Trichoderma harzianum* que está relacionada com o micoparasitismo (hidrolase família 76) foi clonada no vetor pc3300GCHI. *Agrobacterium* EHA 105 contendo os vetores binários (gene *bar* e gene *nptII* que, confere resistência ao antibiótico canamicina), foram inoculadas em 10 mL de meio LB contendo o antibiótico rifampicina (100 mg/L) por um período de 16 horas. A cultura diluída de *Agrobacterium* foi adicionada a explantes foliares de tabaco (cv. Xanthi), e mantidas durante 30

minutos sob leve agitação. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para placas contendo meio MS sólido suplementado com 1 mg/L de BAP por 48 horas a 28°C, no escuro, e posteriormente, cultivados por três semanas em meio de regeneração (MS, BAP, Rifampicina e glifosinato de amônio). Os calos formados foram transferidos para frascos contendo meio de enraizamento e as plantas positivas, selecionadas para aclimação. (ARAGÃO *et al.*, 2002).

Análise das plantas regeneradas e bioensaios

Após a regeneração das plantas positivas forma feitos testes para analisar a integração e expressão das seqüências introduzidas por PCR. As plantas regeneradas expressando os genes *sm1* e hidrolase foram avaliadas quanto a resistência ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

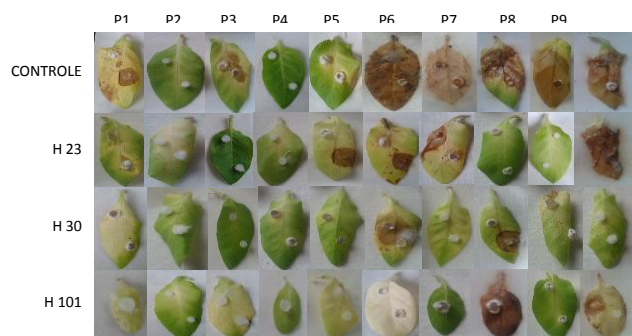


Figura 1: Folhas de *Nicotiana tabacum* selvagem e linhagens transformadas (H23, H30 e H101) 72 horas após inoculação com o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

Foi possível observar que plantas de tabaco selvagem e as 15 linhagens transformadas apresentaram crescimento e morfologia semelhantes em todos os tempos avaliados.

Dentre as linhagens transgênicas, H23, H30 e H101 apresentaram maior tolerância ao fitopatógeno no tempo de 72 horas quando comparadas a linhagem controle (Figuras 1). E ainda, um reduzido número de folhas foi lesionado nesse tempo.

Desta maneira, a transformação genética de plantas utilizando esse gene de *Trichoderma harzianum* constitui uma ferramenta de grande potencial para a produção de plantas resistentes a fungos fitopatogênicos. Além disso, o conhecimento adquirido com a expressão e validação desses genes em plantas modelo surge como excelente alternativa para o estudo de aplicabilidade desses genes em cultivares de interesse econômico, como o feijão.

CONCLUSÃO

Plantas transgênicas resistentes a fungos patogênicos utilizando o gene codificador da hidrolase 76 de *Trichoderma harzianum* representa uma excelente estratégia a ser utilizada em biotecnologia agrícola. Essa possibilidade pode representar aumento da competitividade agrícola, da segurança alimentar e, ainda, o ganho ambiental pela menor aplicação de agroquímicos.

AGRADECIMENTOS

Laboratório de Engenharia Genética da Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, FJL; BRASILEIRO, ACM. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 1, p. 01–10, 2002.
- HERMOSA, E.; BOTELLA, L.; KECK, E.; JIMÉNEZ, J. A.; MONTERO-BARRIENTOS, M.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A.; MONTE, E.; NICOLAS, C. The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stress. **J Plant Physiol**, v. 168, p. 1295–1302, 2011.
- LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: omics to the field. **Annu Rev Phutopathol**, v. 48, p. 395–497, 2010.
- MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; NICOLÁS, C.; MONTE, E. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp 70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. **J Plant Physiol**, v. 167, p. 659–665, 2010.
- VIEIRA, P. M.; SIQUEIRA, A. C. G.; STEINDORFF, A. S.; LINHARES, S. J. S.; SILVA, R.N., ULHOA, S.J. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. **BMC genomics**, v. 14, n. 177, p. 1–11, 2013
- WOO, G. L.; YANG, M. L.; YIN, H. Q.; JAFFER, F.; MITTELMAN, M. W.; SANTERRE, J. P. Biological characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer synthesized with fluoroquinolones. **J Biomed Mater Res**, v. 59, p. 35–45, 2002.