

Transformação genética de *Trichoderma* sp. com GFP e análise de micoparasitismo contra *Fusarium decemcellulare*

Fernandes, Joelma dos Santos^{1,3}; Silva, Ingrid Jarline Santos^{2,3}; Queiroz, Claudia Afras^{1,3}; Sousa, Thiago Fernandes^{2,3}; Hanada, Rogério Eiji¹; Silva, Gilvan Ferreira³

¹Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, ²Universidade Federal do Amazonas, ³Embrapa Amazônia Ocidental.

E-mails: jsan.fernandes@gmail.com, gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

O gênero *Trichoderma* possui uma ampla diversidade de espécies com capacidade de sintetizar diversos metabólitos eficazes no biocontrole de pragas agrícolas. Além disso, estes também são capazes de agir contra outros fungos por meio da ação micoparasitária. A utilização de linhagens transformadas com proteínas fluorescentes é considerada uma ferramenta útil na diferenciação dos microrganismos. Este trabalho teve como objetivo obter linhagens de *Trichoderma* sp.(INPA 2475) expressando a proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein* - GFP) para análise de micoparasitismo em *Fusarium decemcellulare* transformado geneticamente com proteína fluorescente vermelha (*Red fluorescent protein* - RFP). Nos resultados obtidos evidenciamos que, o método de transformação genética mediado por polietileno glicol (PEG) é um método eficiente. Dentre os transformantes obtidos foi selecionado um transformante geneticamente estável, com características morfofisiológicas semelhantes a linhagem selvagem. A linhagem transformante, assim como a selvagem apresentou desenvolvimento mais rápido que o *F. decemcellulare*. Na análise de micoparasitismo após cinco dias de cultivo *in vitro* as hifas dos fungos entrelaçavam-se e em algumas regiões observou-se pareamento das hifas com simetria mais linear quando cultivadas em meio de cultura BDA, já em meio de cultura SNA as hifas apresentaram forma ondulada ou enrolada. Concluímos que, a estratégia de obtenção de protoplastos e transformação do *Trichoderma* sp. (INPA 2475) via PEG mostrou-se uma metodologia eficiente, com obtenção de transformantes geneticamente estáveis. Quanto ao antagonismo foi observado o enovelamento das hifas do transformante antagonista na interação com o fitopatogênio indicando mecanismo típico de micoparasitismo.

Palavras-Chave: *Trichoderma* sp.; Transformação com GFP; Micoparasitismo

Introdução

O gênero *Trichoderma* possui uma ampla diversidade de espécies com capacidade de sintetizar diversos metabólitos que despertam interesse econômico, principalmente na área agronômica (Khan et al. 2020). Metabólitos secundários produzidos por espécies deste gênero representam uma ampla variedade de compostos químicos podendo ser voláteis, fixos intra e

extracelular. São responsáveis pela proteção das plantas contra patógenos, disponibilização de nutrientes, solubilização de minerais e atividades farmacológicas, características que conferem uma alternativa ao uso de pesticidas (Patil et al. 2016).

Algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de induzir o sistema de defesa e promover o crescimento de plantas. Conseguem crescer rapidamente, sendo um fator favorável na competição com fitopatógenos (Pascale et al. 2017; Sood et al. 2020; Ferreira e Musumeci 2021). Possuem capacidade de micoparasitar outros fungos não apenas pela síntese de metabólitos importantes para o biocontrole de fitopatógenos, mas também pela ação de interação por meio do estrangulamento de hifas (Kubicek et al. 2011; Mukherjee et al. 2022).

Um dos obstáculos para analisar a interação planta-fungo ou antagonista-fitopatógeno é diferenciar o(s) fungo(s) de interesse dos demais fungos presentes no ambiente (Lu et al. 2004). E para resolver esta dificuldade utilizam-se a técnica de transformação genética com proteínas fluorescentes GFP (*green fluorescent protein*) ou RFP (*red fluorescent protein*) (Mukherjee et al. 2022). Estas também são chamadas de proteínas repórteres, são utilizadas como biomarcadores na análise da interação entre organismos de interesse (Inglis et al. 1999; Lu et al. 2004; Armesto et al. 2012). O método tem como vantagem não necessitar de substrato algum ou cofatores adicionais durante a análise de interação. Os fungos expressando GFP ou RFP podem ser facilmente analisados por meio da microscopia de epifluorescência ou microscopia eletrônica confocal e de fluorescência (Lu et al. 2004).

O objetivo desta pesquisa foi obter linhagens de *Trichoderma* sp. (CMIANPA 2475) expressando a proteína fluorescente verde (GFP) para utilização na análise de micoparasitismo contra fitopatógeno *Fusarium decemcellulare* (CPAA-Fdc307), agente causal de superbrotamento, transformado geneticamente com o gene *dsRed* que codifica RFP.

Material e Métodos

Microrganismos e Condições de Cultivo

O fungo filamentoso *Trichoderma* sp. (CMIANPA 2475) foi isolado como endófito de *Scleronema micranthum* Ducke no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus/AM, Brasil. O cultivo deste isolado foi realizado em

meio BDA (10g/L dextrose, 16g/L ágar e 250g/L batata) e em meio SNA (1g/L KH_2PO_4 , 1g/L KNO_3 , 0,5g/L MgSO_4 , 0,5g/L KCl, 0,2g/L Glicose, 0,2g/L Sacarose e 20g/L de ágar) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas para análise da estrutura das hifas e micoparasitismo.

Para o preparo da suspensão de conídios utilizada no processo de obtenção de protoplastos foi realizada a raspagem de placas com 7 dias de crescimento da colônia do fungo, a suspensão obtida foi colocada em meio TB3 (200g/L de sacarose, 3g/L de peptona e 3g/L de extrato de levedura) e filtrada com gaze. Cerca de 25 mL da suspensão a 10^6 conídios/ml foi transferida para um frasco com 250 mL de meio TB3 e colocado sob agitação a 120 rpm, 25 °C durante cerca de 15h. O acesso ao patrimônio genético foi realizado de acordo com a solicitação SISGEN cadastro de Acesso No AB6B14F.

Vetor utilizado na transformação genética de *Trichoderma* sp. (CMIAINPA-2475)

Foi utilizado o vetor pSC001(GFP-higromicina), sendo que, para evitar a sua linearização foi realizada a amplificação do cassete, que contém o gene repórter *gfp* (*green fluorescent protein*) controlado pelo promotor P_{trpC} e o gene de resistência ao antibiótico higromicina B fosfotransferase (*hph*) controlado pelo promotor P_{toxA}- 5'UTR.

Na reação de amplificação foram adicionados cerca de 25 ng do vetor pSC001 para reação com volume final de 50 µL, sendo 1,5 µL de cada *primer* (10 µM) (T3 5' GCAATTAACCCTCACTAAAG 3', T7s 5' GTAATACGACGCACTATAG 3'), 5 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris -HCl pH 8,4; 1% Triton X-100), 1,5 µL dNTP (0,8 mM), 1U de DNA polimerase (DNA Polimerase High Fidelity - *Cellco*) e água destilada. As condições de PCR: 94 °C por 2 min., 40 ciclos a 94 °C por 15 seg., 66 °C por 30 seg., 68 °C por 1 min., 68 °C por 5 min. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (etBr).

Obtenção de Protoplastos

Os protoplastos foram produzidos por meio da massa micelial obtida da suspensão de esporos cultivados durante 15 h. A massa micelial foi filtrada e

lavada com 100 mL de água destilada e em seguida lavada com 10 mL de KCl 1,2 M. Posteriormente, 500 mg de massa seca foi ressuspensa em 12,5 ml de KCl 1,2 M contendo 250 mg de *Driselase* (D9515 - Sigma Aldrich) e 200 mg de enzima *Lysing Enzyme* (L1412 - Sigma Aldrich), mantido em agitação a 80 rpm a 30 °C durante 3 a 4 horas.

O desenvolvimento dos protoplastos foi conferido por meio da microscopia. Após digestão total da massa micelial, foi realizada a filtração dos protoplastos em filtro de nylon estéril de 40 µm, removendo os fragmentos de hifas. Em seguida os protoplastos foram centrifugados a 3.200 rpm durante 10 min. e descartado o sobrenadante cuidadosamente para que fosse adicionado 12,5 mL do tampão STC (940 mg/L de Sacarose, 10 ml/L de Tris-HCl (1 M pH 8,0), 50 ml/L de CaCl₂ 1 M), repetindo o processo de centrifugação e descarte do sobrenadante novamente. O *pellet* foi ressuspensa em 1 ml de STC e transferido para um microtubo e centrifugado durante 5 min. a 5.000 rpm. E por fim, o *pellet* foi novamente ressuspensa em STC, misturado cuidadosamente e diluído para concentração de 10⁷ protoplastos/ml.

Teste de dose letal para seleção dos possíveis transformantes

Foram testadas diferentes concentrações de higromicina B (0 µg, 100 µg, 200 µg e 300 µg) com a linhagem selvagem. Pequenos fragmentos de meio de cultura com micélios foram colocados em placas com meio de cultura BDA suplementado com higromicina B e cultivados durante 15 dias. As placas foram analisadas com 3, 7 e 15 dias de cultivo. E para a transformação foi escolhida como dose letal 300 µg/mL.

Transformação genética de *Trichoderma* sp. (CMIAINPA 2475) via PEG

O isolado *Trichoderma* sp. (CMIAINPA 2475) foi transformado com o cassete contendo GFP-higromicina (GFP-Hyg). A transformação genética foi realizada com 100 µL da suspensão de protoplastos a 10⁷ protoplastos/ml em tubos de 15 ml, juntamente com 90 µL de STC e 10 µL (15 a 20 µg) do cassete amplificado por PCR. No controle negativo foi utilizado água no lugar do DNA. O conteúdo de cada tubo foi misturado e incubado a temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, adicionado 1 ml de polietilenoglicol (PEG) 8000 40% em cada tubo, misturado e incubado a temperatura ambiente por mais 20 min. Após foi

acrescentado 5 ml de TB3 líquido aos tubos e colocados sob agitação a 80 rpm, em *overnight*.

A seleção dos possíveis transformantes foi realizada pela adição de cerca de 2,5 ml da suspensão deixada em *overnight* em 50 ml de meio seletivo TB3 semi-sólido (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona, 200 g/L de sacarose e 4 g/L de Ágar) suplementado de 300 µg/ml de antibiótico higromicina B. Também foram preparadas placas para o controle, positivo (sem antibiótico) e negativo (com antibiótico). Aguardou-se o desenvolvimento dos transformantes por cerca de dois dias.

Caracterização dos Transformantes

A extração do DNA total de *Trichoderma* sp. CMIANPA 2475 foi realizada de acordo com o método de CTAB (Doyle e Doyle, 1997). Em seguida, foi tratado com RNase (Invitrogen), quantificado em NANODROP e gel de agarose a 0,8%. A confirmação dos possíveis transformantes foi realizada pela detecção do gene de resistência a higromicina-B via PCR, com os primers *hph forward* - 5' TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT 3' e *reverse* - 5' CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG 3'. A confirmação do gene repórter *gfp* ocorreu por meio dos primers *gfp forward* - 5' ACGTAAACGGCCACAAGT 3' e *reverse* - 5' TGCTCAGGTAGTGGTTGT 3'. Preparadas reações com volume final de 15 µL, contendo 50 ng de DNA total dos transformantes e do selvagem (controle), 1 µL de primers *forward* e *reverse* (0,3 µM) específico para o gene de interesse, 1,5 µL tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris -HCl pH 8,4; 1% Triton X-100; MgCl₂ (1,5 mM)), 1,6 µL dNTP (0,8 mM), 1U de enzima Easytaq (*Synapse Biotechnology*) e água destilada. As condições de PCR foram as seguintes: 94 °C por 3 min. para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 seg., 66 °C (*hph*) e 56 °C (*gfp*) por 30 seg. para anelamento dos primers, 72 °C por 1 min. e extensão final a 72 °C por 10 min. A quantificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Teste de estabilidade mitótica

A análise de estabilidade mitótica dos transformantes foi realizada por meio de cinco repicagens sucessivas em meio de cultura BDA sem antibiótico. E então transferidas as linhagens transformadas para o meio seletivo na

concentração de 300 µg de higromicina B. Após este período as linhagens transformantes foram novamente analisadas quanto às características morfofisiológicas comparadas com a linhagem selvagem.

Deteção da proteína fluorescente verde (GFP)

O microscópio de epifluorescência Axio Imager M2 (Zeiss) do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental foi utilizado para deteção das proteínas fluorescentes nas linhagens transformadas.

Interação antagonista - fitopatógeno

A análise ocorreu por meio do co-cultivo dos transformantes *Trichoderma* sp. (CMIAINPA-2475/GFP) e *F. decemcellulare* (CPAA-Fdc307/RFP) em placas com BDA e SNA durante cinco dias, o mesmo procedimento foi realizado com as linhagens selvagens como controle. Nas placas, entre os fungos, foram colocadas lamínulas esterilizadas para crescimento das hifas na superfície e posteriormente fossem observadas em microscópio confocal Leica TCS SP8 do Laboratório do Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABIO) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. Além das lamínulas pequenos fragmentos foram retirados dos meios de cultura da região de interação dos fungos e colocados em lâminas para análise microscópica.

O acesso ao patrimônio genético foi realizado de acordo com a solicitação SISGEN cadastro de Acesso No AB6B14F.

Resultados e Discussão

A combinação de 250 mg de *Driselase* e 200 mg de enzima *Lysing Enzyme* em tampão KCl 1,2 M possibilitou a digestão do micélio e obtenção eficiente de protoplastos.

O teste de letalidade com higromicina revelou que na concentração de 100 µg o desenvolvimento ocorreu normalmente semelhante a placa sem antibiótico, com 200 µg foi possível observar uma pequena redução no desenvolvimento, e com 300 µg foi observada uma alta redução do crescimento quando comparada a dose de 200 µg. O tamanho das colônias com 7 dias em 300 µg é o equivalente ao observado na placa sem antibiótico com três dias de

crescimento. Portanto, a concentração de 300 µg foi utilizada na seleção dos possíveis transformantes com dois dias de crescimento.

O resultado demonstra que, esta linhagem diferentemente de muitas espécies de *Trichoderma*, nas quais já foram realizados testes de antibiótico (Mach et al. 1994; Calcáneo-Hernández et al. 2020), é capaz de se desenvolver com o dobro ou até o triplo da concentração de higromicina B. O que chama atenção para a possível capacidade de detoxificação de aminoglicosídeos.

No processo de transformação genética do *Trichoderma* sp. CMIAINPA 2475 mediado por polietileno glicol (PEG) foram obtidos transformantes geneticamente estáveis e confirmada a presença das sequências dos genes contidos no cassete (*gfp-hph*) por meio da caracterização molecular. Dentre os transformantes um foi selecionado para análise do processo de interação *in vitro*, utilizando como antagonista o isolado 2475 (figura 1A e 1D) e o fitopatógeno *F. decemcellulare* CPAA-Fdc307 transformado com RFP (figura 1B e 1E).

Na análise da interação *in vitro*, as linhagens transformadas de *Trichoderma* sp. (INPA 2475) quando comparadas à linhagem selvagem após cinco dias de cultivo, mantiveram a capacidade de desenvolvimento rápido, inibindo o desenvolvimento do *F. decemcellulare* (Figura 1C). As imagens da microscopia mostram claramente a interação das hifas dos dois isolados transformados (Figura 1F, 1I, 1L e 1M). As hifas de ambos entrelaçam de forma mais alongada, havendo vários pontos onde as hifas ficam lado a lado quando cultivadas em meio BDA (Figura 1G e 1H). Quando cultivados em meio SNA, as hifas de *Trichoderma* sp. (CMIAINPA 2475) apresentaram forma ondulada ou enrolada (Figura 1J), sendo possível observar hifas verdes enroladas fortemente na massa de hifas vermelhas do *F. decemcellulare* (Figura 1L e 1M).

Algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de realizar micoparasitismo (Rodríguez et al. 2021; Mukherjee et al. 2022), inclusive em espécies de *Fusarium*. Conforme relatos de Amira et al. (2017), além do pareamento de hifas do *T. harzianum* (*Ths97*) e *F. solani* (*Fso14*) foi observado o enlace das hifas do antagonista as do fitopatógeno, havendo também a inibição do crescimento *in vitro* de *Fso14*. A atividade micoparasitária de *T. atroviride* a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal de doença em tomateiro, com significativa inibição do fitopatógeno 92,11% também tem sido reportado (Nofal et al. 2021).

Neste trabalho observou-se o envelhecimento das hifas típico de micoparasitismo, principalmente quando o cultivo ocorre em meio SNA, porém nas imagens analisadas não foram observados pontos de penetração e saída de hifas do antagonista no fitopatógeno durante o período de cinco dias de co-cultivo em meio BDA, conforme evidenciados em outros estudos (Mukherjee et al. 2022; Nofal et al. 2021).

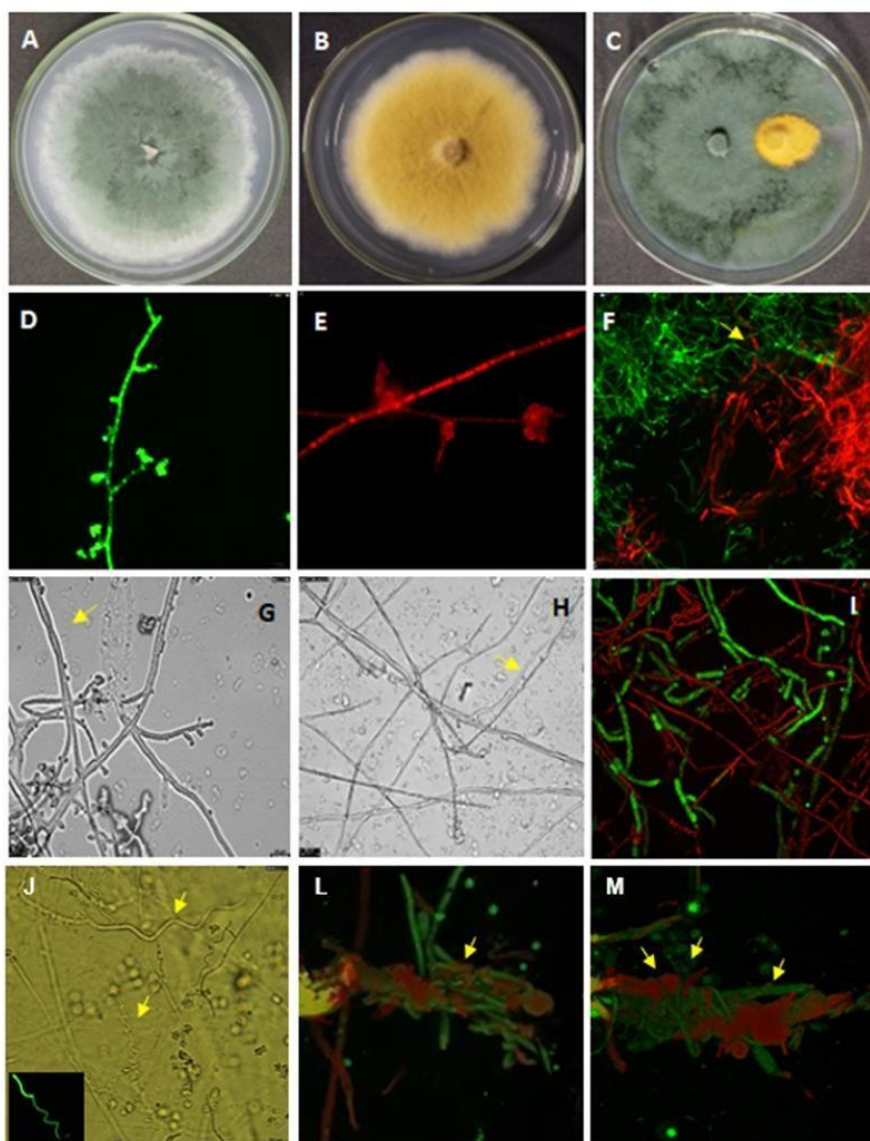


Figura 1. Interação in vitro entre *Trichoderma* sp. (INPA 2475) e *F. decemcellulare* (CPAA-Fdc307), após cinco dias de cultivo em BDA e SNA. Em A: colônia do *Trichoderma* sp. (CMIAINPA 2475) transformado com GFP; em B: colônia do *F. decemcellulare* transformado com RFP; C: co-cultivo do *Trichoderma* sp. (CMIAINPA2475) e *F. decemcellulare*, transformados; D: hifa de *Trichoderma* sp. CMIAINPA 2475) expressando GFP, em BDA; E: hifa e conídios de *F. decemcellulare* expressando RFP, em BDA; F: micélio de ambos os fungos transformados com proteínas fluorescentes; G e H: pareamento das hifas de *Trichoderma* sp. CMIAINPA 2475) e *F. decemcellulare* selvagens, respectivamente, em BDA; I: entrelaçadas hifas dos transformantes, em BDA; J: hifa *Trichoderma* sp. (CMIAINPA 2475) em meio SNA; L e M: entrelace das hifas *Trichoderma* sp. (CMIAINPA 2475) em meio SNA (microscopia eletrônica confocal e fluorescência).

Conclusão

A estratégia de obtenção de protoplastos e transformação do *Trichoderma* sp. INPA2475 via PEG mostrou-se uma metodologia eficiente, com obtenção de transformantes geneticamente estáveis. Quanto ao antagonismo foi observado o enovelamento das hifas do transformante antagonista na interação com o fitopatógeno indicando mecanismo típico de micoparasitismo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES-Procad AmazonMicro e CAPES-Amazônia Legal pelo apoio financeiro e concessão de Bolsas de estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas por meio do programa Biodiversa (Edital N°007/2021).

Referências

- Amira, M.B.; Lopez, D.; Mohamed, A.T.; Khouaja, A.; Chaar, H.; Fumanal, B.; et al. 2017. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control* 110: 70-78.
- Armesto, C.; Maia, F.G.M.; Abreu, M.S.; Figueira, A.R.; Silva, B.M.; Monteiro, F.P. 2012. Genetic transformation with the *gfp* gene of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from Coffee with blister spot. *Genetics and Molecular Microbiology* 43(3): 1222-1229.
- Calcáneo-Hernández, G.; Rojas-Espinosa, E.; Landeros-Jaime, F.; Cervantes-Chávez, J.A.; Esquivel-Naranjo, E.U. 2020. An efficient transformation system for *Trichoderma atroviride* using the *pyr4* gene as a selectable marker. *Brazilian Journal of Microbiology* 51(4): 1631-1643.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19(1): 11-15.
- Ferreira, F.V.; Musumeci, M.A. 2021. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(5): 90.
- Inglis, P.W.; Queiroz, P.R.; Valadares-Inglis, M.C. 1999. Transformation with green fluorescent protein of *Trichoderma harzianum* 1051, a strain with biocontrol activity against *Crinipellis pernicioso*, the agent of witches'-broom disease of cocoa. *The Journal of General Applied Microbiology* 45(2): 63-67.

- Khan, R.A.A.; Najeeb, S.; Hussain, S.; Xie, B.; Li, Y. 2020. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms* 8(6): 817-838.
- Kubicek, C.P.; Herrera-Estrella, A.; Seidl-Seiboth, V.; Martinez, D.A.; Druzhinina, I.S.; Thon, M.; et al. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* 12(4): R40.
- Lu, Z.; Tombolini, R.; Woo, S.; Zeilinger, S.; Lorito, M.; Jansson, J.K. 2004. In Vivo study of *trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 3073-3081.
- Mach, R.L.; Schindler, M.; Kubicek, C.P. 1994. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current Genetics* 25(6): 567-570.
- Mukherjee, P.K.; Mendoza-Mendoza, A.; Zingelinger, S.; Horwitz, B.A. 2022. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews* 39: 15-33.
- Nofal, A.M.; El-Rahman, M.A.; Abdelghany, T.M.; El-Mongy, M.A. 2021. Mycoparasitic nature of Egyptian *Trichoderma* isolates and their impact on suppression *Fusarium* wilt of tomato. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31(1): 1-8.
- Pascale, A.; Viñale, F.; Manganiello, G.; Nigro, M.; Lanzuise, S.; Ruocco, M.; et al. 2017. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection* 92: 176-181.
- Patil, A.S.; Patil, S.R.; Paikrao, H.M. 2016. *Trichoderma* secondary metabolites: Their biochemistry and possible role in disease management. In: Choudhary, D.; Varma, A. (eds). *Microbial-mediated induced systemic resistance in plants*. Springer, Singapore. p. 69-102.
- Rodríguez, M.C.H.; Evans, H.C.; Abreu, L.M.; Macedo, D.M.; Ndacnou, M.K.; Bekele, K.B.; Barreto, R.W. 2021. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. *Scientific Reports/Nature* 11(1): 5671-5700.
- Sood, M.; Kapoor, D.; Kumar, V.; Sheteiw, M.S.; Ramakrishnan, M.; Landi, M.; Araniti, F.; Sharma, A. 2020. *Trichoderma*: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants (Basel)* 9(6): 762-786.
- Tomico-Cuenca, I.; Mach, R.L.; Mach-Aigner, A.R.; Derntl, C. 2021. An overview on current molecular tools for heterologous gene expression in *Trichoderma*. *Fungal Biology and Biotechnology* 8(1): 11-27.