

Otimização de metodologia para produção e regeneração de protoplastos de *Trichoderma* spp.

Adriana de Oliveira Bosco Seabra¹, Elder Tadeu Barbosa², Marcio Vinicius de Carvalho Barros Cortês³, Murillo Lobo Junior⁴

Trichoderma spp. são fungos de vida livre altamente interativos nas raízes das plantas e no solo. São considerados saprófitos e têm despertado interesse científico e comercial, especialmente pelo seu uso como agente de controle biológico e na produção de enzimas para uso industrial. No controle biológico, as espécies de *Trichoderma* podem atuar por meio dos seguintes mecanismos: parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência. Sua colonização nas raízes pode promover o crescimento das plantas, aumentando assim a sua produtividade. Há uma grande diversidade de *Trichoderma* spp. nos solos brasileiros de onde é possível selecionar isolados de interesse mas, além disso, é possível melhorar a sua capacidade natural de biocontrole ou promoção de crescimento por meio de métodos de melhoramento. Dentre vários tipos de procedimentos, destaca-se a obtenção de protoplastos, (células destituídas de parede celular), tornando-as receptoras e permeáveis à entrada do DNA exógeno. Com o intuito de promover o melhoramento genético de cepas de *Trichoderma* spp., este trabalho objetivou estabelecer um protocolo para obtenção de protoplastos, estabelecendo concentrações do sistema lítico, estabilizadores osmóticos, tempos de protoplastização e de regeneração deste. Utilizou-se o isolado TR 601 de *Trichoderma harzianum* (BRM29399), pertencente à Coleção de Fungos e Microrganismos Funcionais da Embrapa Arroz e Feijão. Realizou-se o cultivo do isolado em meio de cultura BDA, com incubação por quatro dias a 25 °C. Posteriormente, preparou-se uma suspensão ajustada para $1,0 \times 10^6$ conídios mL⁻¹. Transferiu-se 1 mL desta suspensão para um erlenmyer contendo 100 mL de meio BD (água destilada, caldo de batata e glicose), o qual foi incubado sob agitação (150 rpm) por 48 horas, a 24 °C. Em seguida, o micélio foi filtrado, lavado seis vezes com o estabilizador osmótico KCl (0,7M, pH 5,7). Para protoplastização, a cada 100 mg de micélio úmido, utilizou-se 5 mL de estabilizador osmótico e enzima lítica, em duas concentrações (5 e 10 mg) para estabelecer a melhor relação entre massa micelial e enzima. Posteriormente, a suspensão foi submetida à agitação a 70 rpm em temperatura ambiente. O ensaio foi realizado em triplicata, onde cada unidade gerou três unidades experimentais (tubos falcon 15 mL), onde se encontravam as diferentes concentrações enzimáticas (5 e 10 mg) e a testemunha, livre de enzimas. Os protoplastos foram observados em microscópio óptico de hora em hora, por quatro horas com quantificação em câmara de Neubauer. A regeneração dos protoplastos foi realizada plaqueando-se 500 µL da suspensão com aproximadamente 15 mL de Meio Completo (0,1% Extrato de Levedura, 0,1% Caseína Hidrolisada, 34,2% Sacarose, 1% Ágar Granulado), acrescido do estabilizador osmótico KCl, 0,7M. Os protoplastos foram incubados por 72 horas a ± 25 °C. Após a regeneração dos protoplastos, verificou-se uma média de 87,6 e 121 colônias de *T. harzianum* recuperadas por placa, respectivamente, para as concentrações de 5 e 10 mg da enzima lítica. A partir deste resultado, os testes entrarão em nova fase, para fundir os protoplastos de duas cepas diferentes de *T. harzianum*, para obtenção de cepas melhoradas.

¹ Estudante de graduação em Farmácia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, estagiária da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, aobseabra@hotmail.com

² Farmacêutico, assistente da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Elder.barbosa@embrapa.br

³ Farmacêutico, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Marcio.cortes@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, murillo.lobo@embrapa.br