

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary POR CEPAS DE *Trichoderma* spp ISOLADAS EM MATO GROSSO DO SUL

Clarice Rossato Marchetti¹, Carlos Eduardo Weirich¹, Arthur Ladeira Macedo², Denise Brentan da Silva³, Cirano José Ulhoa⁴, Maria Rita Marques⁴

1. Estudante do programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação – INBIO/UFMS
 2. Estagiário de Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – FACFAN/UFMS
 3. Professora e Pesquisadora da Faculdade de Farmácia, Tecnologia de Alimentos e Nutrição – FACFAN/UFMS
 4. Professora e Pesquisadora do Instituto de Biociências – INBIO/UFMS
- Autorização de coleta: MMA/ICMBio/SisBio – 50900-1 (08/09/2015)
Apoio financeiro: UFMS, CAPES, FUNDECT

Resumo

Espécies de *Trichoderma* sp são usadas para o biocontrole de patógenos de plantas. O efeito antagônico destas espécies é uma combinação de vários mecanismos, incluindo competição por nutrientes e micoparasitismo direto, que envolve a produção de metabólitos antifúngicos e enzimas de degradação da parede celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de 57 cepas do gênero *Trichoderma*, isolados em diferentes locais e biomas do Mato Grosso do Sul, em inibir o crescimento do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Todas as cepas de *Trichoderma* testadas foram capazes de inibir entre 70 e 94% o crescimento do patógeno. Estas cepas produziram proteases, β -1,3-glucanases, N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGases), fosfatase ácidas e quitinases com diferentes graus de atividade. Análises dos metabólitos voláteis por CG/EM mostraram variações entre as diferentes cepas, quando em contato com o patógeno, o que sugere o envolvimento destes metabólitos no micoparasitismo.

Palavras-chave: biocontrole; micoparasitismo; metabólitos secundários;

Introdução

O controle biológico é atualmente uma alternativa bastante utilizada para redução do uso de agrotóxicos, pois oferece soluções sustentáveis e biológicas com potencial de controlar pragas agrícolas, sem causar danos à saúde humana, de animais e ao meio ambiente e não demanda grandes investimentos (Lipke, 2018).

O gênero *Trichoderma* é considerado um excelente biocontrole devido à sua alta capacidade de inibir o crescimento de várias espécies de fungos fitopatogênicos (Vinale et al., 2014). Atuam através de vários mecanismos que incluem a competição por nutrientes e espaço, antibiose e indução mecanismos de defesa de plantas, bem como pela capacidade de parasitar o do fitopatógeno (Qualhato et al., 2013; Waghunde et al., 2016). Foi demonstrado que uma das estratégias utilizadas pelas espécies de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos é a produção de enzimas hidrolíticas como proteases, β -1,3-glucanases, NAGases, fosfatases ácidas e quitinases, que atuam sobre a parede celular do patógeno, causando sua desestruturação e consequente morte celular (Monteiro et al, 2015). Outras estratégias incluem a produção de metabólitos secundários, muitos deles voláteis, que inibem o crescimento do fitopatógeno por mecanismos ainda pouco conhecidos (Yuef et al, 2018).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é o agente causal do mofo branco em mais de 400 espécies vegetais, incluindo várias economicamente importantes, como soja, feijão e milho (Meyer et al., 2018). Esta doença é a principal causa da perda de produtividade em muitas culturas em todas as principais regiões produtoras do mundo. No Brasil, cerca de 10 milhões de hectares da área brasileira de cultivo de soja estão infestados pelo patógeno (CONAB, 2018). Neste trabalho avaliou-se o potencial de 57 cepas de *Trichoderma* spp isoladas do solo do Cerrado e do Pantanal, bem como cepas endofíticas de espécies nativas destes biomas, como agentes de controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*. Para tanto, foram realizados ensaios enzimáticos e de confronto para produção de metabólitos voláteis *in vitro*, a fim de prospectar a presença de enzimas chave e metabólitos voláteis nos processos de micoparasitismo.

Metodologia

A cultura de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary foi cedida pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Gado de Corte. As 57 cepas de *Trichoderma* sp foram classificadas em dois grupos: **Grupo 1:** Inclui as cepas numeradas de 1 a 10, que são provenientes de diferentes localidades do MS, obtidas de amostras de solo, ou endofíticas de folhas de espécies nativas do Cerrado e Pantanal; **Grupo 2:** Inclui as cepas numeradas de 11 a 57, que são endofíticas, isoladas de raízes e folhas de *Aspilia gracileae*, uma espécie endêmica do Morro do Urucum, Corumbá, MS.

1) **Testes de Inibição do Patógeno:** Foram realizados testes de inibição do crescimento de *S.sclerotiorum* *in vitro* por dois métodos: A) Confrontação direta, onde fragmentos de cultura do patógeno e das cepas a serem testadas são inoculadas na mesma placa e incubadas por até 7 dias. Posteriormente mede-se o halo de inibição do crescimento do patógeno, comparado com as placas controle (Martins-Corder e Melo, 1998). Foi utilizada uma escala proposta por Bell et al. (1992), variando de 1 a 5, sendo o valor 1 aquele de maior capacidade de inibição,

ou 100%. Os testes foram realizados em três repetições. B) Avaliação do efeito de metabólitos voláteis: Ensaios realizados segundo Bharat et al. (1980). O diâmetro da colônia do patógeno foi estimado quando ambos os fungos (patógeno e fungos teste) cobriram completamente as placas controle. (Bharat et al., 1980); McCalley et al. (1992). Os testes foram realizados com cinco repetições.

2) **Análise dos Metabólitos Voláteis por CG/EM:** As cepas T₁, T₈, T₂₅, T₂₇ e T₄₆, foram submetidas aos procedimentos dos testes de metabólitos voláteis segundo Bharat et al. (1980). Após 168 horas os compostos voláteis foram submetidos à micro-extração em fase sólida por 50 min e analisados por CG/EM. Foi utilizado equipamento Shimadzu modelo CG 17A, com detector seletivo de massas modelo QP 5000 (Shimadzu), coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme) e He como gás carreador. As temperaturas foram de 220 °C no injetor e 300 °C no detector. A temperatura do forno foi programada para variar de 60 °C a 240 °C, com acréscimo de 3°C/min.

3) **Ensaios de Atividade Enzimática:** As 57 cepas de *Trichoderma* utilizadas neste trabalho foram cultivadas em meio TLE contendo fragmentos de parede celular liofilizada de *S.sclerotiorum* a 5% como fonte de carbono (Lopes et al., 2012), durante 48 h. Estas culturas foram filtradas e consideradas como extrato bruto enzimático. Foram realizados testes para as seguintes enzimas: a) **protease:** segundo Cabral et al. (2004), utilizando azocaseína (0,25% p/V) como substrato, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para aumentar 1 absorbância por minuto; b) **β-1,3-glucanase:** segundo Noronha e Ulhoa (2000) utilizando laminarina como substrato, Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto; c) **N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase):** segundo Ulhoa e Peberdy (1992), utilizando *p*-nitrofenil-β-N-acetilglicosamina como substrato, uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de *p*-NP por minuto; d) **fosfatase ácida:** utilizando *p*-nitrofenilfosfato (2 mM) como substrato segundo Monteiro et al., (2015), uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de *p*-NP por minuto; e) **quitinase:** segundo Qualhato et al. (2013), utilizando *p*-nitrofenil-β-N-acetilglicosamina como substrato, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de açúcar redutor em um minuto de reação. A concentração de proteína nas amostras foi determinada segundo Bradford (1976). A atividade específica foi expressa em unidade de atividade enzimática, por mg de proteína. Os testes foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

A maioria dos *Trichoderma* inibiu entre 70 e 85% o crescimento do fitopatógeno, nos testes de antagonismo. Esta tendência se repetiu nos testes de avaliação de metabólitos voláteis, onde observou-se um grande número de cepas capazes de inibir entre 85 e 94%, o crescimento de *S.sclerotiorum* (Figura 1).

As análises por CG/EM mostraram variação do perfil de metabólitos voláteis entre as diferentes cepas e entre tratamentos e controles, indicando a influência do patógenos sobre a síntese de voláteis das cepas analisadas. Foram identificadas até o momento duas substâncias voláteis das classes dos sesquiterpenos e lactonas (Figura 2). O ester cíclico 6 pentyl-α-pyrone foi relatado em *T. viride*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii* por Vinalle et al, (2014) e o β - Cedrene foi relatado por Lee et al. (2016) em várias cepas de *Trichoderma*. Outros metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp, já foram descritos na literatura, tais como pironas, terpenóides, esteroides, gliotoxinas, gliovirinas (Reino et al., 2008) e alguns peptaibols, que consistem de 4 a 21 aminoácidos não proteinogênicos (Daniel et al, 2007; Brito et al, 2014). Stoppacher et al (2010), analisaram espécies de *Trichoderma* e encontraram vários metabólitos voláteis como alcanos, álcoois, cetonas, pironas (lactonas), furanos, monoterpênicos e sesquiterpenos. Lopes et al (2012) e (Li et al. (2018), também detectaram o reconhecimento e a produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* frente aos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente. As análises por CG/MS ainda estão em andamento.

Nos ensaios de atividade enzimática os resultados foram variáveis para cada enzima analisada. A) β 1,3 glucanase – as cepas T₁, T₁₁, T₁₃, T₂₅, T₃₄ e T₄₆ apresentaram as melhores atividades; B) NAGase foram as cepas T₈, T₁₈, T₂₅ e T₂₇; C) Protease foram as cepas T₂₃, T₂₅, T₂₇ e T₃₄; D) Fosfatase ácida foram as cepas T₁, T₉, T₁₃, T₃₄, T₄₁, T₄₆ e E) e Quitinase as cepas T₁, T₈, T₁₂, T₂₀, T₂₅, T₂₇ e T₄₆. Nos ensaios de atividade enzimática, a adição de fragmentos de parede celular de *S. sclerotiorum* desempenharam o papel de mimetizar a presença do patógeno, induzindo, portanto, a secreção de enzimas degradadoras de parede celular de fungos (Lopes et al, 2012). Estes resultados mostram que, em termos de produção e/ou atividade enzimática as cepas analisadas apresentam perfis genéticos variáveis, mesmo aquelas pertencentes ao grupo 2, provenientes da mesma comunidade endofítica (Figura 3). Uma variação no perfil dos testes de produção de voláteis e hiperparatismo entre os dois grupos, também foi observada (Figura 4).

Estas análises indicam algumas cepas mais promissoras para estudos posteriores sendo: T₁, T₈, T₂₅, T₂₇ e T₄₆. Os resultados sugerem que a capacidade dos isolados de *Trichoderma* em inibir o crescimento de fitopatógenos é um processo que depende de vários fatores, tais como habilidade de produzir e excretar diferentes tipos de enzimas envolvidas no micoparasitismo, bem como a capacidade de síntese e liberação de metabólitos voláteis. Segundo Lopes et al. (2012), *Trichoderma* spp possuem uma ampla variedade de mecanismos para sobrevivência e proliferação, incluindo ataque físico e degradação de outros fungos e utilização de carboidratos complexos. Com base nessas características, eles são importantes biocontroladores de fungos fitopatogênicos de plantas podendo, também, ser utilizados para produção de enzimas industriais e de antibióticos.

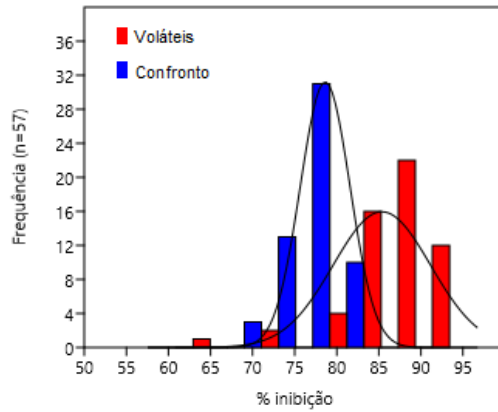


Figura 1: Resultados dos testes de antagonismos (confronto) e produção de metabólitos (voláteis). O gráfico mostra a % de inibição de crescimento do fitopatôgeno dos *Trichoderma* spp (n= 57).

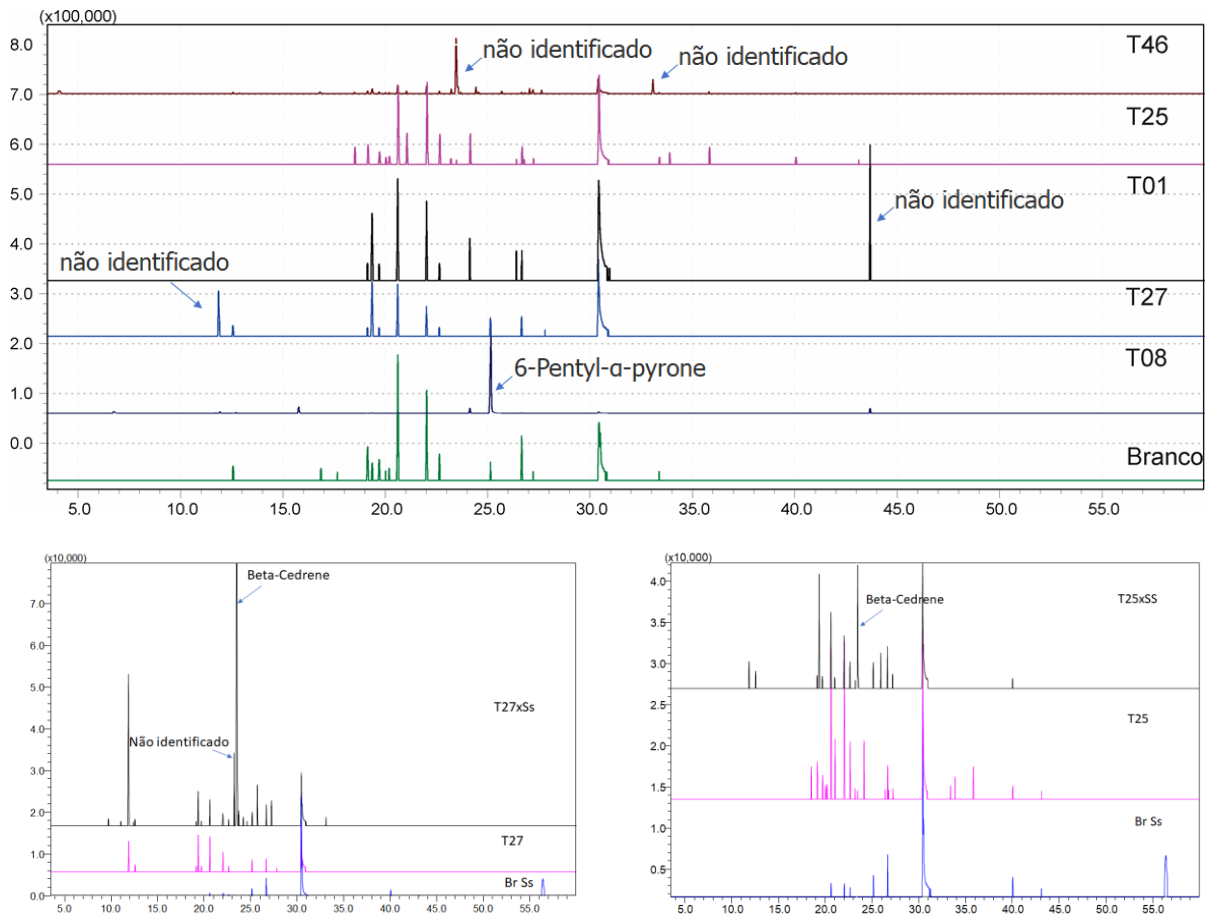


Figura 2: GC-MS cromatograma de algumas substâncias voláteis produzidas pelas cepas de *Trichoderma* (T₁, T₈, T₂₅, T₂₇, T₄₆), sendo o branco apenas meio de cultura BDA.

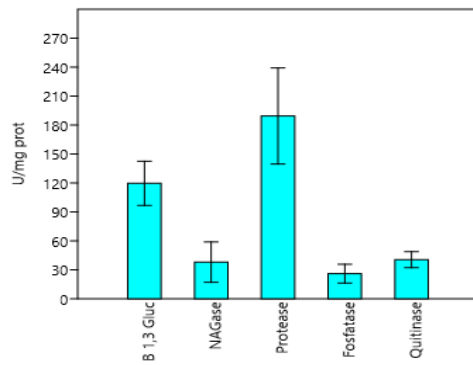


Figura 3: Análise exploratória de variáveis quantitativas. O boxplot comparativo dos grupos 1: ($T_1 - T_{10}$) e 2: ($T_{11} - T_{57}$) mostra que a produção de β -1,3 glucanase dos *Trichoderma* apresentam maior variabilidade que quitinase, protease e NAGase sendo a produção de fosfatase ácida, a de menor variabilidade.

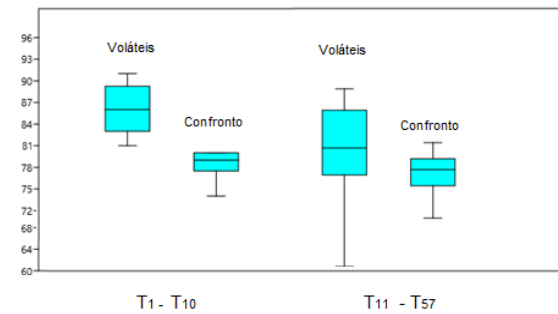


Figura 4: Resultados dos testes de antagonismos (confronto) e produção de metabólitos (voláteis). Análise exploratória e comparativas de variáveis numéricas (% de inibição de crescimento do fitopatôgeno) dos grupos 1: ($T_1 - T_{10}$) e 2: ($T_{11} - T_{57}$).

Conclusões

- Os resultados obtidos sugerem que todas as cepas de *Trichoderma* analisadas são, a princípio, candidatas em potencial, para serem utilizadas no controle biológico de fitopatôgenos. Também foi possível observar que independente da origem (solo, epíficas ou endofíticas), as cepas apresentaram alta capacidade de inibir o crescimento de *S.sclerotiorum in vitro*, mas apresentaram perfis de atividade enzimática bastante variável.
- Estão em andamento 1) a identificação de todas as cepas por técnicas de biologia molecular; 2) ensaios de controle biológico utilizando as cepas que apresentaram os melhores resultados de atividade enzimática em condições de campo e 3) análise dos metabólitos secundários majoritários produzidos, quando as cepas são cultivadas em meio contendo parede celular de *S.sclerotiorum*.

Referências bibliográficas

- Bell, D.K.; Wells, H.D.; Markhan, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Phytopathology*, v.72, p.379-382, 1982.
- Bharat, R.; Singh, V.N.; Singh, d.b. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant and Soil*, Varanasi, v.57, p.131-135, 1980.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254. 1976.
- Brito, JPC; Ramada, MHS; Magalhães, MTQ; Silva, LP and Ulhoa, CJ. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. Springer Plus, pag. 2-10, 2014.
- Cabral, C. M.; Cherqui, A.; Pereira, A.; Simões, N. Purification and Characterization of Two Distinct Metalloproteases Secreted by the Entomopathogenic Bacterium *Photobacterium* sp. Strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 70 (7). p. 3831-3838. 2004.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira – grãos: oitavo levantamento. Brasília: Conab, v.5, maio/2018.
- Daniel JFS, Filho ER. Peptaibols of *Trichoderma*. *Review. Nat Prod Rep* 24:1128-1141, 2007.
- Li, N; Alfiky, A; Wang, W; Islam, Md; Nourollahi, K; Liu, X; & Kang, S. Volatile Compound-Mediated Recognition and Inhibition Between *Trichoderma* Biocontrol Agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, Volume 9, 1-16. 2018.
- Lipke, P N. What We Do Not Know about Fungal Cell Adhesion Molecules *Journal of Fungi*, **4**(2), 59. 2018.
- Lopes, FA; Steindorff, AS; Geraldine, AM; Brandão, RS; Monteiro, VN; Lobo, M Jr; Coelho, AS; Ulhoa, CJ; Silva, RN. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol.* **116** (7):815-24. 2012.
- Martins-Corder, M.P.; Melo, I.S. de. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. *Sci. agric.*, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 1-7.1998.
- Meyer, MC; Campos, HD; Godoy, CV; Utiamada, CM; Seii, AH; Dias, AR; Jaccoud Filho, DS; Borges, EP; Juliatti, FC; Junior, JN; da Silva, LHCP; Sato, LN; Martins, MC; Venâncio, WS. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, safra 2017/18: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos, v 1, Embrapa Soja. 2018.
- Monteiro, VN; Steindorff, AS; Almeida, FBR; Lopes, FAC; Ulhoa, CJ; Félix, CR e Silva, RN. *Trichoderma reesei* - Mycoparasitism against *Pythium ultimum* is coordinated by G-alpha Protein GNA1 Signaling. *Journal Microb Biochemistry Technology* 7:1. 2015.
- Noronha EF, Ulhoa CJ. Characterization of a 29-KDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Lett* 183:119-123. 2000.
- Qualhato, T.F.; Lopes, F.A.C.; Steindorff, A.S.; Brandão, R.S.; Jesuino, R.S.A.; Ulhoa, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: valuation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett* 35:1461-1468. 2013.
- Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemi Rev* 7:89-123, 2018.
- Ulhoa CJ, Peberdy JF. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enz Microbial Technol* 14(3):236-240. 1992.
- Vinale, F; Sivasithamparam, K; Ghisalberti, EL; Woo, SL; Nigro, M; Marra, R; Lombardi, N; Pascale, A; Ruocco, M Lanzuise, S; Manganiello, G; & Lorito, M. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal* 8, (Suppl-1, M5) 127-139. 2014.
- Waghunde, RR; Shelake, RM and Sabalpara, NA. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, Vol. 11(22), pp. 1952-1965. 2016.
- Yuef, M. H., Torres-Castillo, J. A., Rodríguez-Herrera, R., López-Santillán, J. A., Estrada-rouaillet, B., & Osorio-Hernández, E. Identification and evaluation of secondary metabolites by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in native strains of *Trichoderma* species. *African Journal of Biotechnology*, 17(37), 1162-1171. 2018.