



3º Simpósio Nacional de Fruticultura

Vila Real, 4 e 5 de dezembro de 2014



Associação
Portuguesa de
Horticultura



Centre for the Research and Technology of
Agro-Environment and Biological Sciences



Centro Operativo e Tecnológico
Hortofrutícola Nacional

Ficha Técnica:

Título: 2º Simpósio Nacional de Fruticultura

Colecção: Actas Portuguesas de Horticultura, nº 23

Editor: ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE HORTICULTURA

Rua da Junqueira, 299 – 1300-338 Lisboa

Coordenação: Raúl Rodrigues e Ana Paula Silva

Autores: vários

Edição e Coordenação: Raúl Rodrigues e Ana Paula Silva

Tiragem: 200 exemplares

ISBN: 978-972-8936-16-7

Avaliação do efeito antagonista de fungos endofíticos contra *Verticillium dahliae* em condições *in vitro*

Diogo Mina¹, José Alberto Pereira¹, Albino Bento¹ & Paula Baptista¹

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO) / Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. pbaptista@ipb.pt

Resumo

A verticilose, causada pelo fungo *Verticillium dahliae*, é uma das doenças da oliveira que mais prejuízo causa a nível mundial. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antagonista de fungos endofíticos contra o *V. dahliae*, com o intuito de selecionar os isolados de forma a poderem vir a ser utilizados no futuro como agentes de luta biológica da verticilose. As espécies fúngicas endofíticas a testar foram isoladas de folhas, ramos e raízes de oliveira da cv. Galega, que é moderadamente tolerante à verticilose.

Desta forma, foram estabelecidas co-culturas entre fungos endofíticos e *V. dahliae* em meio PDA. Os fungos endofíticos testados foram *Penicillium purpurogenum*, *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma gamsii*, *Fusarium oxysporum* e *Phomopsis columnaris*. Como controlo utilizaram-se co-culturas da mesma espécie fúngica. Durante a interação avaliou-se o crescimento radial, a taxa de esporulação e a viabilidade dos esporos das espécies fúngicas, e caracterizou-se macro- e microscopicamente as colónias, em especial na zona de interação.

De entre as espécies testadas, *T. gamsii* e *F. oxysporum*, foram as que inibiram mais o crescimento (26% e 31%, respetivamente), a produção (68% e 48%, respetivamente) e a germinação (100% e 90%, respetivamente) de esporos de *V. dahliae*, quando comparado com o controlo. À exceção de *P. purpurogenum* e *P. columnaris*, o mecanismo adotado pelos fungos endofíticos testados foi “agonismo”, caracterizado pela redução do crescimento de *V. dahliae* e aumento de crescimento dos fungos opositores. Adicionalmente, foram verificadas alterações morfológicas nas colónias interagentes e, em especial, no *V. dahliae*, destacando-se o desenvolvimento de colónias com bordos irregulares e alteração da coloração do micélio. Observações feitas ao microscópio ótico na zona de interação mostraram a ocorrência de várias alterações morfológicas no fungo *V. dahliae*, que incluía a vacuolização e lise das hifas, e a produção de cristais. Estas alterações foram sobretudo verificadas na presença dos fungos endofíticos *P. columnaris* e *F. oxysporum*. Espera-se que os resultados obtidos permitam o desenvolvimento de uma nova forma de luta biológica contra a verticilose pela utilização de fungos endofíticos.

Palavras-chave: oliveira, verticilose, agentes de luta biológica, antagonismo.

Abstract

Evaluation of the antagonist effect of endophytic fungi against *Verticillium dahliae* in *in vitro* conditions

Verticillium wilt, caused by the fungus *Verticillium dahliae*, is considered to be the major cause of olive-crop damage worldwide. The main aim of this work is to evaluate the antagonistic activity of endophytic fungi against *V. dahliae*, in order to select isolates that can be used in the future as biological control agents against this disease. The endophytic fungi studied were isolated from roots, twigs and leaves of olive tree, cv. Galega, which is known to be moderately tolerant to verticillium wilt.

Dual cultures between *V. dahliae* and endophytic fungi were established in PDA medium. The fungal endophytes tested were *Penicillium purpurogenum*, *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma gamsii*, *Fusarium oxysporum* and *Phomopsis columnaris*. Dual

cultures with the same fungal species were used as controls. Throughout the interaction were evaluated the internal radial fungal growth, sporulation rate and sporulation viability of both fungal species. Macro- and microscopic characterization of fungal colonies were also performed, particularly in the interacting zone.

Among the endophytes studied, *T. gamsii* and *F. oxysporum* were the species that most inhibited *V. dahliae* growth (26% and 31%, respectively), sporulation (68% and 48%, respectively) and germination (100% and 90%, respectively), when compared with control. With the exception of *P. purpurogenum* and *P. columnaris*, the mechanism displayed by the tested endophytes was "agonism", characterized by the reducing of *V. dahliae* growth and by the increasing of endophytes growth. Additionally, morphological changes were observed in the interacting fungal species, especially in *V. dahliae*, by showing irregular colony borders and color changes in mycelium. Observations made by microscope in the interacting zone showed several morphological alterations including vacuolation and lysis of hyphal of *V. dahliae*, and crystals production. These changes were mainly observed in the presence of *P. columnaris* and *F. oxysporum* endophytes. The results obtained will be very useful to designed a new form of biological control against verticillium wilt, through the use of endophytic fungi.

Keywords: olive tree, verticilosis, biological control agents, antagonism.

Introdução

A oliveira é a principal cultura nos países do Mediterrâneo (Moral et al., 2009), onde se localiza cerca de 98% da área mundial de olival (González, 2002). Aproximadamente 10 milhões de toneladas de azeitonas são produzidas anualmente a nível mundial, sendo 90% canalizada para a produção de azeite e 10% para azeitona de mesa. Das doenças que atacam a oliveira destaca-se a verticilose, diagnosticada pela primeira vez em Itália nos anos 40. A verticilose, causada pelo fungo *Verticillium dahliae*, afeta mais de 200 espécies vegetais, geralmente numa fase mais jovem da planta. *Verticillium dahliae* produz microesclerócios (estruturas reprodutoras constituídas por células muito compactas) capazes de resistir no solo durante vários anos. Em condições favoráveis, o microesclerócio desenvolve-se, originando as hifas que constituem o organismo adulto (Jiménez et al., 2002). Este fungo patogénico penetra no hospedeiro através das suas raízes, levando a uma quebra no crescimento, murchidão e desfoliação. A verticilose é atualmente um dos problemas mais preocupantes devido à importância económica das perdas causadas e à dificuldade do seu controlo (Quesada et al., 2012). Desde há muito que se sabe que o uso de microrganismos poderá ter um grande potencial na luta biológica contra organismos patogénicos do solo (Cook, 1985; Tyvaert et al., 2014; Alabouvette, 2009; Shittu et al. 2009a). Os organismos endofíticos podem ser descritos como fungos ou bactérias que colonizam os tecidos internos de espécies vegetais sem lhes causar sintomas visíveis de doença. O seu modo de ação na luta biológica é variado podendo atuar de dois modos: diretamente sobre o patógeno (parasitismo, antibiose, competição por nutrientes) ou indiretamente por indução de resistência na planta hospedeira (Eyles et al., 2010; Gao et al., 2010). São vários os trabalhos que se têm focado no uso de fungos e bactérias na luta biológica contra o *Verticillium* (Li et al., 2012; Lin et al., 2009; Tyvaert et al., 2014; Shittu et al., 2009b). No entanto, e tanto quanto é do nosso conhecimento, não houve ainda nenhum trabalho que explorasse as potencialidades de microrganismos endofíticos na luta contra doenças da oliveira, incluindo a verticilose. Neste contexto, no presente trabalho pretendeu-se identificar e selecionar fungos endofíticos antagonistas de *V. dahliae*. Os endófitos testados foram isolados da cultivar Galega descrita como sendo moderadamente tolerante à verticilose.

Material e Métodos

Endofíticos testados. Foram selecionadas as cinco espécies mais abundantes de fungos endofíticos (*Fusarium oxysporum*, *Phomopsis columnaris*, *Penicillium purpurogenum*,

Macrophomina phaseolina, *Trichoderma gamsii*) isolados previamente de raízes, raminhos e folhas da cv. Galega. Estas espécies encontram-se depositadas na Coleção de Culturas da Escola Agrária, do Instituto Politécnico de Bragança. A identificação dos isolados foi conseguida através da amplificação e sequenciação da região Espaçadora Transcrita Interna (ITS) do DNA ribossomal (rDNA), usando os iniciadores oligonucleotídicos universais ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). A obtenção de inóculo para os ensaios da atividade antagonista foi feita a partir de culturas fúngicas em crescimento ativo em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), a 25°C no escuro.

Estabelecimento de co-culturas. Os ensaios da avaliação da atividade antagonista de fungos endófitos contra *V. dahliae* foram efectuados recorrendo ao método da co-cultura. Para o seu estabelecimento foram usadas Placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 10 mL de meio BDA, na superfície do qual foi colocado um inóculo de cada espécie fúngica (com cerca de 0,5 cm de diâmetro), retirados das regiões periféricas das respetivas culturas em crescimento ativo, a uma distância de 3 cm entre si. Como controlo foram usadas culturas com 2 inóculos da mesma espécie fúngica. A incubação das culturas foi efetuada no escuro, a uma temperatura de 25 ± 2 °C. Foram preparadas 5 Placas de Petri para cada combinação fúngica.

Parâmetros avaliados nas co-culturas. Foi avaliado o crescimento, a produção e a viabilidade dos esporos das duas espécies fúngicas interagentes.. O crescimento dos fungos foi avaliado ao longo do tempo através da medição do raio interno (entre os inóculos) das colónias, até que as colónias dos dois fungos se tocassem. Para a avaliação da produção e da viabilidade de esporos, prepararam-se inicialmente suspensões de esporos de cada fungo interagente numa solução aquosa de Tween 80 (0,02% v/v). A contagem de esporos foi feita numa câmara de Neubauer, sendo a viabilidade determinada pelo cálculo da percentagem de germinação dos esporos. Para tal, inocularam-se placas de Petri contendo meio agar/agar (15 g/L) com 1 mL de suspensão de esporos (10^7 esporos/mL). Ao fim de 24 horas de incubação a 25 ± 2 °C no escuro, determinou-se a percentagem de germinação (contagem do número de esporos germinados e não germinados), a partir de um total de 300 esporos por placa de Petri. Foi ainda efectuada uma caracterização morfológica macroscópica e microscópica das colónias.

Análise estatística. Os resultados do crescimento radial, esporulação e germinação são apresentados na forma de diferenças percentuais relativamente ao controlo. Os dados foram tratados através de uma análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SPSS v.18 e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos indicaram que das cinco espécies fúngicas endofíticas, *F. oxysporum*, *T. gamsii* e *M. phaseolina* inibiram significativamente o crescimento de *V. dahliae* quando comparado com o controlo em cerca de 30%, 26% e 5%, respectivamente (Fig. 1A). A elevada capacidade combativa ou a agressividade exibida por estas duas espécies endofíticas contra o *V. dahliae* foi ainda confirmada pelo aumento significativo do seu crescimento (8%, 29% e 4%, respectivamente) face ao controlo. Segundo Tuininga (2005), neste tipo de interação em que ocorre redução de crescimento de uma das espécies e aumento de crescimento da outra espécie, é designada por antagonismo. Nestas situações, a inibição do crescimento do fungo opositor é usualmente atribuída à produção de compostos voláteis e/ou difusíveis, tais como antibióticos (Boddy, 2000). Por vezes estão ainda envolvidos metabolitos ou enzimas extracelulares (Heilmann-Clausen & Boddy, 2005). De facto, a produção de metabolitos antimicrobianos e de enzimas que degradam a parede celular tem sido verificada em vários géneros de fungos (Frisvad et al., 2008; Druzhinina et al., 2011, Teixeira et al., 2012). Assim sendo, é provável que estes mesmos compostos possam estar envolvidos na inibição do crescimento de *V. dahliae*. As restantes espécies endofíticas testadas, *P. columnaris* e *P. purpurogenum*, não promoveram uma inibição do crescimento de *V. dahliae*. Para a última espécie endofítica foi inclusive observado uma inibição significativa do seu crescimento pelo

fitopatogénio, em cerca de 5% quando comparado com o controlo. Este comportamento sugere a ocorrência de um segundo tipo de interação, o antagonismo, por ocorrer redução de crescimento de uma das espécies fúngicas sem prejuízo para a outra (Tuininga, 2005). Neste tipo de interação, o mecanismo responsável pela inibição do crescimento da espécie opositora é essencialmente por “interferência de hifas”. Este mecanismo é referido como sendo mediado pela produção de metabolitos difusíveis, não-enzimáticos, excretados apenas quando as hifas interagentes estabelecem contacto (Boddy, 2000).

Na seleção de microrganismos antagonistas é adicionalmente importante avaliar a sua ação inibitória na esporulação e na germinação dos esporos do fitopatogénio, por constituírem fatores decisivos do processo de infeção. Assim sendo, no final do ensaio das co-culturas procedeu-se à quantificação de esporos e à análise da sua viabilidade em ambas as colónias fúngicas. Neste estudo excluiu-se a espécie endofítica *P. columnaris* por não ter esporulado. Verificou-se que, do total dos isolados endofíticos testados, apenas *T. gamsii* inibiu significativamente a esporulação (68%; Fig. 1B). Relativamente à germinação dos esporos, tanto *T. gamsii* como *F. oxysporum* afectaram negativamente *V. dahliae* (cerca de 100% e 90%, respetivamente; Fig. 1C) face ao controlo. Estas mesmas espécies fúngicas endofíticas, quando em co-cultura com *V. dahliae*, aumentaram a produção de esporos em cerca de 40% face ao controlo, e a espécie *T. gamsii* adicionalmente a sua viabilidade traduzida pelo aumento significativo do número de esporos germinados (299%; $p < 0,001$), quando comparado com o controlo. Por sua vez, a espécie endofítica *M. phaseolina* não produziu esporos na presença de *V. dahliae*.

A observação macroscópica das co-culturas revelou ainda alterações ao nível da colónia de *V. dahliae*. Na presença de *P. columnaris*, *M. phaseolina* e *F. oxysporum*, o fungo *V. dahliae* apresentava colónias com margens irregulares e alteração da coloração quando comparado com o controlo (dados não mostrados). A produção intra- e intercelular de pigmentos foi anteriormente observada em várias interações interespecíficas, à semelhança do observado no presente estudo (Donnelly & Boddy 2001). A caracterização microscópica da zona de interação para estas mesmas co-culturas indicou várias alterações morfológicas no fungo *V. dahliae*, que incluía a vacuolização e lise das hifas, e a produção de cristais (dados não mostrados). No que concerne aos fungos endofíticos, apenas se registou a produção de exsudados de coloração vermelha por parte do endófito *P. purpurogenum* quando em co-cultura com *V. dahliae*, situação não observável no controlo (dados não mostrados).

Conclusões

Com este estudo verificou-se que os fungos endofíticos *F. oxysporum*, *T. gamsii* e *M. phaseolina* foram os que exibiram uma maior ação inibitória no crescimento, esporulação e germinação de *V. dahliae*. *Fusarium oxysporum* e *P. columnaris* induziram ainda alterações morfológicas macroscópicas e microscópicas ao nível das colónias fúngicas de *V. dahliae*. Apesar destas espécies endofíticas constituírem potenciais agentes de luta biológica contra a verticilose, é necessário confirmar a sua ação antagonista em condições *in vivo*, através da realização de ensaios em estufa

Agradecimentos

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Projeto PTDC/AGR-AAM/102600/2008 “Isolamento e seleção de fungos endofíticos da oliveira para luta biológica contra *Colletotrichum acutatum* e *Verticillium dahliae*”.

Referências

- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q. & Steinberg, C. 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 184, 529–544.
- Boddy, L. 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 185-194
- Cook, R.J. (1985) Biological control of plant pathogens: theory to application. *Phytopathology* 75, 25–29.
- Donnelly, D.P., Boddy, L. 2001. Mycelial dynamics during interactions between *Stropharia caerulea* and other cord-forming, saprotrophic basidiomycetes. *New Phytologist* 151: 691-704
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. & Kubicek, C.P., 2011. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9:749–759
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R. & Mohammed, C. 2010, Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist* 185: 893-908
- Frisvad, J.C., Andersen, B. & Thrane, U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research* 112: 231-240.
- Gao, F., Zhou, B.J., Li, G.Y., Jia, P.S., Li, H. & Zhao, Y.L. 2010. A glutamic acid-rich protein identified in *V. dahliae* from an insertional mutagenesis affects microsclerotial formation and pathogenicity. *PLoS One* 5:e15319
- González, V. 2002. La importancia de la olivicultura ecológica. P. 9-16. In: V. González & R. Muñoz (eds.), *La Olivicultura ecológica en España*. Editora y Distribuidora El Olivo, S.L.L., Jaén.
- Heilmann-Clausen, J. & Boddy, L. 2005. Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microbial Ecology* 49: 399-406
- Jiménez, A., Simón, V.J. & Martínez, J.D. 2002. El olivar regado en la provincia de Jaén. *Investigaciones geográficas*. Nº 28. Págs. 5-32.
- Li, C., Shi, L., Han, Q., Hu, H., Zhao, M., Tang, C. & Li, S. 2012. Biocontrol of *Verticillium* wilt and colonization of cotton plants by an endophytic bacterial isolate *Journal of Applied Microbiology* 113: 641–651
- Lin, L., Quiao, Y., Ju, Z., Ma, C., Liu, Y., Zhou, Y. & Dong, H. 2009 Isolation and Characterization of endophytic *Bacillus subtilis* Jaas ed1 Antagonist of Eggplant *Verticillium* wilt. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73(7): 1489-1493
- Liu, Y. & Yang, Q. 2007. Cloning and heterologous expression of aspartic protease SA76 related to biocontrol in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* 277:173–181
- Liu, Y., Yang, Q. & Song, J. 2009. A new serine protease gene from *Trichoderma harzianum* is expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya* 45:28–32
- López-Escudero, F.J., del Río, C., Caballero, J.M. & Blanco-López, M.A. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 79-85.
- Moral, J. & Trapero, A. 2009. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant disease* 93 (10):1028-1036.

- Oliveira, I., Pereira, A., Lino-Neto, T., Bento, A. & Baptista, P. 2012. Fungal diversity associated to the olive moth, *Prays oleae* Bernard: a survey for potential entomopathogenic fungi. *Microbial Ecology* 63: 964-974.
- Quesada, J.M., Penyalver, R., López, M.M. 2012. Epidemiology and Control of Plant Diseases Caused by Phytopathogenic Bacteria: The Case of Olive Knot Disease Caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Pathology*. Dr. Christian Joseph Cumagun (Ed.). InTech
- Shittu, H.O., Castroverd, D.C.M., Nazar, R.N. & Robb, J. 2009a. Plant-endophyte interplay protects tomato against a virulent *Verticillium*. *Planta* 229:415–426.
- Shittu, H.O., Shakir, A., Nazar, R., Robb, J. 2009b. Endophyte-induced *Verticillium* protection in tomato is range-restricted. *Plant Signaling & Behavior* 4(2):160-161
- Teixeira, M., Martins, M., Silva, J., Kirsch, L., Fernandes, O., Carneiro, A., De Conti, R. & Durán, N. 2012. Amazonian Biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-Characterizations, antibacterial activities and their toxicities *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 300 6(3):300-311
- Troian, R., Steindorff, A., Ramada, M., Arruda, W. & Ulhoa, C. 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes *Biotechnology Letters* 36:2095–2101
- Tuininga, A.R. 2005. Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology. In the fungal community, its organization and role in the ecosystem. Dighton, J., White, J. F. & Oudemans, P. (Ed.). London, U.K. Taylor & Francis, pp 265-283.
- Tyvaert, L., Franc, S.C., Debode, J. & Hofte, M. 2014. The endophyte *Verticillium* Vt305 protects cauliflower against *Verticillium* wilt. *Journal of Applied Microbiology* 116:1563--1571
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T.J. (Ed.) San Diego, USA. Academic Press, pp. 315-322.

Quadros e figuras

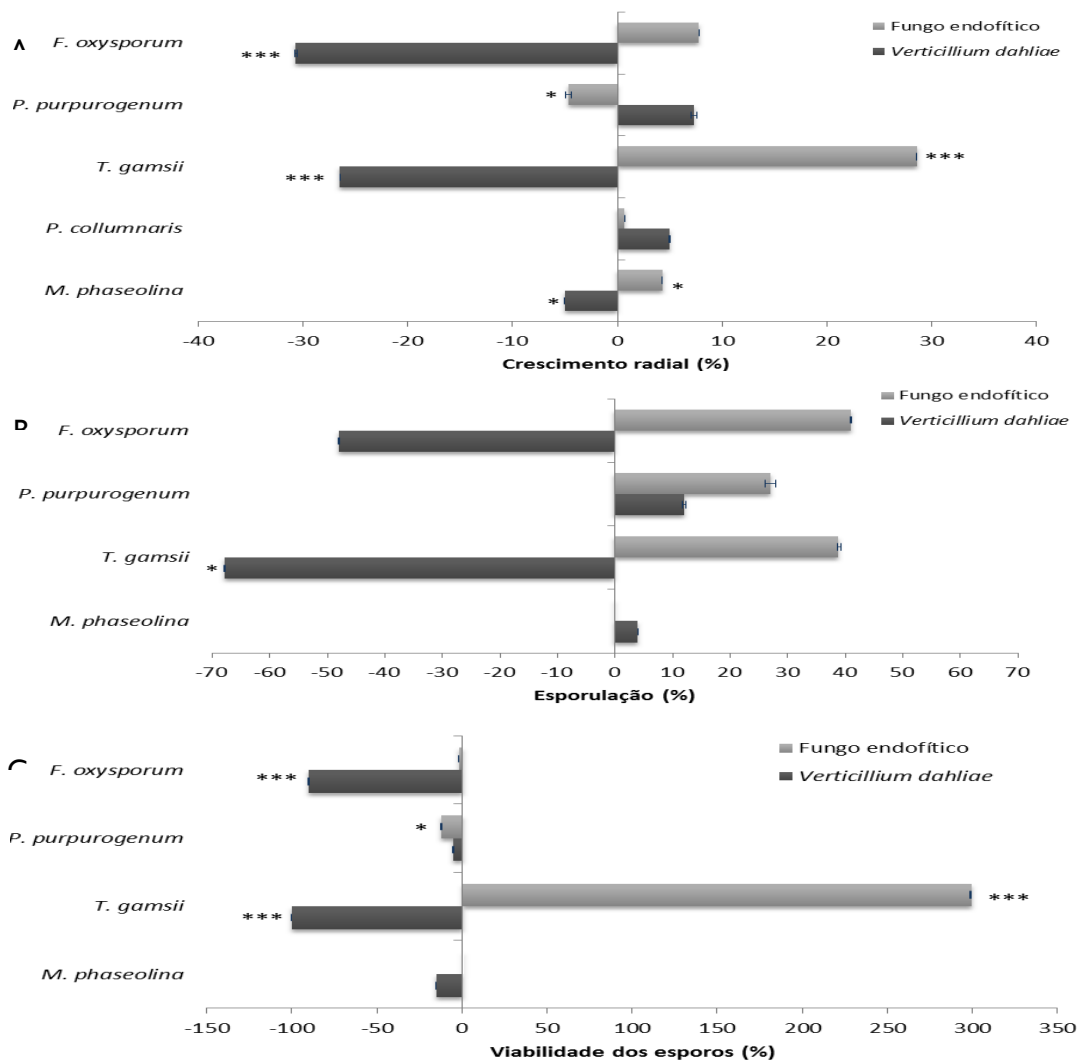


Figura 1. Diferenças (A) no crescimento do raio interno, (B) na taxa de germinação e (C) na viabilidade dos esporos (média \pm erro padrão, n = 5) dos fungos endofíticos e de *Verticillium dahliae* em relação aos respectivos controlos. O crescimento foi avaliado após 5-6 dias em co-cultura, tendo a taxa de esporulação e a viabilidade dos esporos sido avaliadas após 15 dias e 14-16 horas do início do ensaio, respectivamente. O aumento ou a diminuição das taxas de crescimento, produção e viabilidade dos esporos são representadas com valores positivos e negativos, respectivamente. *P. columnaris* não esporulou em meio de cultura neste estudo. Os asteriscos representam valores estatisticamente diferentes do controlo em *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001.