



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

Efeito da planta hospedeira no potencial antagonista de fungos endofíticos contra *Colletotrichum acutatum* em condições *in vitro*

Fátima Martins, José Alberto Pereira, Albino Bento & Paula Baptista

Centro 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

Vários estudos realizados na última década têm evidenciado o potencial de fungos endofíticos em promover a resistência das plantas hospedeiras a doenças. No entanto, o efeito que a planta hospedeira exerce no potencial antagonista de fungos endofíticos contra fitopatogénios é pouco conhecido. Num estudo anterior verificamos que o fungo endofítico *Penicillium commune*, isolado de *Olea europaea* cv. Cobrançosa, inibia o crescimento do fitopatogénio *Colletotrichum acutatum*, que constitui o principal agente causal da gafa na oliveira. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das folhas da oliveira cv. Cobrançosa no antagonismo exibido por *P. commune* contra *C. acutatum* em condições *in vitro*. Estabeleceram-se co-culturas em meio agar com as duas espécies fúngicas na presença e na ausência (controlo) da folha previamente esterilizada e isenta de endófitos. O fitopatogénio foi inoculado em simultâneo, e 10 e 12 dias após o endófito. Durante os doze dias após a inoculação do fitopatogénio, foi avaliada o tipo de interação fúngica bem como o crescimento radial, esporulação e germinação das duas espécies. Adicionalmente foi determinado, durante o ensaio, a percentagem de folhas colonizadas pelo endófito e fitopatogénio. Os resultados obtidos indicaram que a folha da oliveira aumentou a atividade antagonista de *P. commune* contra *C. acutatum*. Na presença de folha, o fungo *P. commune* reduziu o crescimento (0,78 vezes), a esporulação (1,13 vezes) e a germinação (1,18 vezes) de *C. acutatum* face ao controlo (sem folha). Esta redução acentuou-se quando o patogénico foi inoculado 10 e 12 dias após o endófito (>1,20 vezes no crescimento, >1,22 vezes na esporulação e >2,07 vezes na germinação, face ao controlo). A maior combatividade/agressividade de *P. commune* face a *C. acutatum* foi confirmado pela elevada percentagem de folhas colonizadas pelo *P. commune* (100%) e pela diminuição da percentagem de folhas colonizadas pelo *C. acutatum*, de 67% para 0%, dos 8 até aos 12 dias de co-cultura. Os resultados obtidos permitem evidenciar o papel da planta hospedeira no mecanismo antagonista exibido pelo fungo endofítico contra o fitopatogénio, e poderá ser bastante útil no aumento da eficiência da luta biológica desta doença.

Palavras-chave: Gafa, *Penicillium commune*, folha de oliveira, antagonismo, crescimento.

Abstract:

Effect of host plant on antagonistic potential of endophytic fungi against *Colletotrichum acutatum* *in vitro* conditions. Several studies performed in the last decade showed the potential of endophytic fungi to promote the resistance of host plants to diseases. However, knowledge about the effect of host plant on antagonist potential of endophytic fungi against phytopathogenic is scarce. In a previous study we verified that the endophytic fungi *Penicillium commune*, isolated from the host plant *Olea europaea* cv. Cobrançosa inhibited the growth of phytopathogen *Colletotrichum acutatum*, which is the main causal agent of anthracnose in olive tree. This study aimed assessing the effect of olive leaves from cv. Cobrançosa on the antagonism displayed by *P. commune* against *C. acutatum* under *in vitro* conditions. Dual cultures on agar medium were established with the two strains either in the presence of olive leaf (+leaf) or in its absence (-leaf) previously sterilized and free of endophytes. The phytopathogen was inoculated simultaneously with the endophytic, or 10 and

12 days after the endophyte inoculation. Within the first 12 days after inoculation of phytopathogenic, the fungi interaction type, as well as the radial growth, germination and sporulation of both fungal strains were evaluated. Additionally, the colonization percentage of leaves by the endophyte and the phytopathogen were assessed in the assay. The results indicated that olive leaf increased antagonist activity of *P. commune* against *C. acutatum*. In the presence of olive leaf (+leaf), *P. commune* fungus reduced the growth (0.78 fold), sporulation (1.13 fold) and germination (1.18 fold) of *C. acutatum* compared to the control (-leaf). This reduction was accentuated when the pathogen was inoculated 10 and 12 days after endophyte (> 1.20 fold in growth > 1.22 fold in sporulation and > 2.07 fold in germination, comparatively to control) The highest combativeness/aggressiveness of *P. commune* towards *C. acutatum* was confirmed by the high percentage of leaves colonized by *P. commune* (100%) and decreased the percentage of leaves colonized by *C. acutatum*, from 67% to 0%, from 8 up to 12 days of co-culture. The results obtained highlight the role of the host plant in antagonists mechanism exhibited by endophytic fungus against phytopathogen, and could be very helpful in improving the efficiency of the biological control of this disease.

Keywords: Gafa, *Penicillium commune*, olive leaf, antagonism, growth.

Introdução

A oliveira é uma das árvores frutíferas mais importante dos países da bacia do Mediterrâneo, incluído Portugal. Extensas áreas ocupadas por olivais na região de Trás-os-Montes apresentam um impacto económico significativo e uma importante dimensão social, ambiental e paisagística. A Gafa da oliveira, causada por *Colletotrichum acutatum*, é uma doença responsável por importantes prejuízos ao nível da quantidade e qualidade da produção (Talhinhas et al., 2011). A luta química tem sido a principal estratégia de controlo adotada (Trapero & Blanco, 1999), através de tratamentos preventivos com produtos cúpricos (Gomes & Cavaco, 2003; Soares et al., 2006). Contudo, verifica-se que os tratamentos químicos não são completamente eficazes na prevenção desta doença, estando ainda associados problemas ambientais e de toxicidade. Neste contexto, torna-se necessário a implementação de medidas que promovam métodos de produção sustentável sendo, neste âmbito, a luta biológica uma alternativa à luta química. Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de microrganismos que vivem de forma assintomática na maioria dos tecidos vegetais, conferindo proteção às plantas contra stresses abióticos e bióticos (Arnold et al., 2003). Estas propriedades têm incentivado a realização de trabalhos que visem a bioprospeção destes fungos para a sua posterior exploração como agentes de luta biológica contra doenças de diversas culturas agrícolas (Mejía et al., 2008; Mendoza & Sikora, 2009). Contudo, o sucesso do uso de fungos endofíticos na luta biológica, requer um conhecimento prévio do modo de ação destes microrganismos e do efeito das interações entre fungo endofítico-planta hospedeira-fitopatogénico, entre outros fatores. Alguns estudos têm mostrado que o efeito benéfico exercido pelos fungos endofíticos sobre a planta hospedeira só é observável quando estabelecem associação. Por exemplo, verificou-se em ensaios laboratoriais e de campo que nem a planta *Dichanthelium lanuginosum* nem o fungo endófito *Curvularia protuberata* conseguem sobreviver separadamente em solos com elevada temperatura (38°C), mas em associação conseguem tolerar altas temperaturas (Rodriguez et al., 2004).

Num estudo anterior verificamos que o fungo endofítico *Penicillium commune*, isolado de folhas de *Olea europaea* cv. Cobrançosa, inibia o crescimento, germinação e esporulação do fitopatogénico *C. acutatum*, em condições *in vitro*. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das folhas da oliveira cv. Cobrançosa no antagonismo exibido por *P. commune* contra *C. acutatum* em condições *in vitro*.

Material e Métodos

Colheita do material vegetal. Selecionaram-se aleatoriamente 7 árvores da cv. Cobrançosa num olival em Mirandela. Em cada árvore, recolheram-se folhas sãs que foram utilizadas para avaliar o seu efeito no potencial antagonista do fungo endofítico *P. commune* contra o fitopatogénico *C. acutatum*.

Esterilização do material vegetal. As folhas foram lavadas em água destilada, e após o seu corte em segmentos quadrados (1cm x 1 cm), procedeu-se à sua esterilização. O processo de desinfeção consistiu na imersão sequencial dos segmentos em etanol 70% (v/v) durante 2 min; lixívia (3-5% cloro ativo) durante 3 min; etanol 70% (v/v) durante 1 min; e três vezes em água destilada estéril (1 min em cada imersão). Com o intuito de eliminar os fungos endofíticos eventualmente presentes nos segmentos foliares procedeu-se a uma segunda desinfeção utilizando o fungicida Calda Bordalesa. Após remoção do excesso de água os segmentos foram transferidos para erlenmeyers contendo uma solução de Calda Bordalesa (3,0 g/mL) que foram postos a agitar (100 rpm/min) durante uma hora. Os segmentos foram em seguida imersos em água destilada estéril por três vezes (1 min em cada imersão).

Estabelecimento de co-culturas. As folhas previamente esterilizadas foram usadas no estabelecimento de co-culturas entre o endófito *P. commune* e o patogénico *C. acutatum*. No estabelecimento das co-culturas foram usadas Placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 10 mL de meio agar (15g/L) na superfície do qual foi colocado um inóculo de cada espécie fúngica (10 µL de suspensão de esporo 10⁶ esporos/mL), a uma distância de 3 cm entre si. Entre os inóculos foi depositado um segmento de folha previamente esterilizada. O fitopatogénico foi inoculado em simultâneo, e 10 e 12 dias após o endófito. Os inóculos fúngicos foram preparados numa solução aquosa de Tween 80 (0,02% v/v) a partir de culturas em crescimento ativo em meio de cultura batata dextrose agar (BDA). Como controlo foram usadas co-culturas sem segmento foliar. A incubação das culturas foi efetuada no escuro, a uma temperatura de 25 ± 2 °C. Foram preparadas 5 Placas de Petri para cada ensaio.

Parâmetros avaliados nas co-culturas. Durante os doze dias após a inoculação do fitopatogénio, foi avaliada o tipo de interação fúngica bem como o crescimento radial, esporulação e germinação das duas espécies fúngicas. Estes parâmetros foram avaliados seguindo a metodologia descrita por Martins et al. (2012). Para as co-culturas com inoculações em simultâneo, foi ainda determinada a frequência de colonização e de ocorrência do endófito e do fitopatogénio nas folhas. Para tal, ao fim de 8 dias de co-cultura o segmento foliar foi transferido para a superfície de meio de cultura BDA contido em Placas de Petri, que foram postas a incubar no escuro a 25 ± 2°C. O crescimento fúngico do segmento foliar foi acompanhado diariamente e à medida que as colónias surgiam estas eram identificadas morfológicamente e contabilizadas.

Análise de Dados. Os resultados do crescimento radial, esporulação e germinação são apresentados na forma de médias mais ou menos o desvio padrão para cada ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SPSS v.18 e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p <0,05). A frequência de colonização (FC,%) foi calculada como sendo a razão entre o número de segmentos foliares com crescimento fúngico e o número total de segmentos analisados, e a frequência de ocorrência (FO, %) foi determinada como a razão entre o número de isolados de uma espécie fúngica e o número total de isolados.

Resultados e Discussão

Neste estudo verificou-se que a presença de folha de oliveira influenciou significativamente a atividade antagonista exibida pelo *P. commune* contra *C. acutatum* (Quadro 1). De uma maneira geral, a folha de oliveira aumentou o efeito antagonista exibido pelo *P. commune* que demonstrou ser variável de acordo com o tempo de inoculação do patogénico (simultâneo ou 10 e 12 dias após o endófito).

Em inoculações simultâneas e na presença de folha, o fungo *P. commune* reduziu significativamente a esporulação de *C. acutatum* (1,13 vezes) quando comparado com o controlo (ausência de folha) (quadro 1). Neste tratamento, o crescimento e a germinação de *C. acutatum* foram inferiores 0,78 e 1,18 vezes face ao controlo, respetivamente, não sendo contudo esta diferença estatisticamente significativa. No que concerne ao fungo endófito, observou-se um aumento significativo do seu crescimento (1,54 vezes), esporulação (1,20 vezes) e germinação (1,13 vezes) face ao controlo.

A atividade antagonista observada foi superior quando o fitopatogénio era inoculado 10 e 12 dias após o endófito (quadro 1). A inoculação ao fim de 10 e 12 dias na presença de folha de oliveira resultou num decréscimo significativo do crescimento (1,20 e 1,50 vezes, respetivamente), esporulação (1,22 e 1,70 vezes, respetivamente) e germinação (2,07 e 3,29 vezes, respetivamente) de *C. acutatum* face ao controlo (co-culturas sem folha). Por sua vez, o fungo endófito, nos mesmos tratamentos, incrementou significativamente o seu crescimento (1,12 a 1,35 vezes), esporulação (1,32 a 1,36 vezes) e germinação (1,10 a 1,16 vezes) quando comparado com o controlo. Os resultados obtidos sugerem que a inoculação prévia de *P. commune* lhe confere uma vantagem competitiva em relação a *C. acutatum* traduzida num aumento da sua atividade antagónica. Trabalhos anteriores demonstraram, à semelhança do presente estudo, que de uma maneira geral, os fungos que ocupam um maior volume de substrato possuem uma maior capacidade combativa em relação aos fungos que ocupam menores volumes de substrato (Zakaria & Boddy, 2002; Wald et al., 2004).

Em todos os tratamentos efetuados, a inibição de *C. acutatum* ocorreu sem o estabelecimento de contato físico entre as colónias interagentes. Martins e colaboradores (2012) em co-culturas estabelecidas com as mesmas espécies fúngicas inoculadas simultaneamente, observaram similarmente uma redução significativa do número de esporos produzidos por *C. acutatum*, sem a ocorrência de contato físico entre as colónias. Segundo Boddy (2000), este mecanismo é descrito como antibiose e está relacionado com a produção de compostos voláteis e/ou difusíveis, tais como antibióticos ou metabolitos extracelulares, e inclusive enzimas extracelulares por parte do fungo antagonista (Heilmann-Clausen & Boddy, 2005). Deste modo, a atividade antagonista exibida por *P. commune* pode ter resultado da secreção destes compostos cuja produção parece ser potenciada pela folha da oliveira. Adicionalmente, a folha pode influenciar indiretamente este mecanismo antagonista, pela produção de substâncias que podem constituir uma fonte de alimento ao endófito e assim, aumentar a sua capacidade combativa. O fungo *P. commune* usado neste estudo foi isolado de folhas de oliveira e, neste tipo de associação endofítica, é sabido que a planta hospedeira tem um papel importante no fornecimento de nutrientes necessários ao desenvolvimento do fungo endófito (Saikkonen et al., 2004).

A resposta da interação entre *P. commune* e *C. acutatum* foi ainda avaliada pela determinação da percentagem de folhas colonizadas por ambas as espécies fúngicas, em inoculações simultâneas, ao longo de 12 dias de co-cultura. Os resultados obtidos confirmam a maior agressividade/combatividade do endófito face ao *C. acutatum* (fig. 1). Verificou-se que percentagem de folhas colonizadas por *C. acutatum* diminuiu ao longo do ensaio de 67% (dia 8) para 0% (dia 12), enquanto que a percentagem de folhas colonizadas por *P. commune* manteve-se nos 100% a partir dos 8 dias de co-cultura até ao final do ensaio (fig. 1A). Por sua vez, a frequência de ocorrência de *P. commune* aumentou de 60% para 100% e a de *C. acutatum* diminuiu de 40% para 0%, desde os 8 dias até aos 12 dias de co-cultura (fig. 1B). Este resultado reforça o potencial deste fungo endófito para poder vir a ser utilizado no futuro como agente de luta biológica contra o *C. acutatum*. É contudo necessário confirmar estes resultados em ensaios *in planta* e em condições mais próximas das verificadas no campo.

Conclusão

Neste estudo verificou-se que a combatividade/agressividade exibida pelo fungo endofítico *P. commune* contra o fitopatogénio *C. acutatum* foi significativamente incrementada por folhas de oliveira, órgão a partir do qual se isolou o endófito. Os resultados obtidos permitem evidenciar o papel da planta hospedeira no mecanismo antagonista exibido pelo fungo endofítico contra o fitopatogénio. Compreender corretamente a interação planta hospedeira e endófito, bem como os mecanismos subjacentes às interações entre endófitos e patógenos, poderá ser bastante útil para o desenvolvimento de estratégias eficazes na luta biológica desta doença.

Agradecimentos

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Projeto PTDC/AGR-AAM/102600/2008 “Fungos entomopatogénicos em pragas da oliveira: isolamento, caracterização e seleção para controlo biológico”.

Referências

- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A. 2003. Fungal endophyte limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15649-15654.
- Boddy, L. 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 185-194.
- Gomes, H.B. & Cavaco, M. 2003. Protecção Integrada da Oliveira-Lista de produtos fitofarmacêuticos, níveis económicos de ataque. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas-Direcção Geral de Protecção das Culturas, Oeiras.
- 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.
- Martins, F., Pereira J.A., Bento A., Baptista P. 2012. Atividade antagonista de fungos endofíticos da oliveira contra *Colletotrichum acutatum*: correlação com a planta hospedeira. *Série atas Portuguesas de Horticultura* (ISBN: 978-972-8936-12-9), nº 21: 237-243. VI Simpósio Nacional de Olivicultura, 15-17 Novembro.
- Mejía, L.C., Rojas, E.I., Maynard, Z., Bael, S.V., Elizabeth, A., Hebbar, P., Samuels, G.J., Robbins, N. & Herre, E.A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4-14.
- Mendoza, A.R. & Sikora, R.A. 2009. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl* 54: 263-272
- Rodriguez, R.J., Redman, R.S., Henson, J.M., in *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, Dighton, J., Jr, White J.F., Oudemans, PEds. (CRC Press, Boca Raton, FL, 2004), pp. 683–695.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trend in Plant Science*, 9(6): 275-280.
- Soares, M.E., Pereira, J.A., Bastos, L. 2006. Validation of a method to quantify copper and other metals in olive fruit by ETAAS. Application to the residual metal control after olive tree treatments with different copper formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:3923-3928.
- Talhinhas, P., Mota-Capitão, C., Martins, S., Ramos, A.P., Neves-Martins, J., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., Silva, M.C., Sreenivasaprasad, S. & Oliveira, H. 2011.

Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* 60: 483-495.

Trapero, A. & Blanco, M.A. 1999. Enfermidades. P.479-532. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar & L. Rallo (eds.), *El Cultivo del Olivo*. Junta de Andalucía, MundiPrensa.

Wald, P., Crockatt, M., Gray, V., Boddy, L. 2004. Growth and interspecific interactions of the rare oak polypore *Piptoporus quercinus*. *Mycological Research*, 108: 189-197.

Zakaria, A.J., Boddy, L. 2002. Mycelial foraging by *Resinicium bicolor*: interactive effects of resource quantity, quality and soil composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 135.

Quadros e figuras

Quadro 1- Crescimento radial (mm), esporulação (10^{-6} conídios/ml) e germinação (média \pm desvio padrão; n=3) de *Colletotrichum acutatum* e *Penicillium commune* em co-cultura na presença (tratamento) e na ausência (controlo) da folha. O fitopatogénio foi inoculado em simultâneo (End + Fito), 10 dias (Endo + Fito 10d) e 12 dias (Endo + Fito 12d) após o endófito. Para cada ensaio, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($p < 0,05$) entre tratamento e respetivo controlo.

		Endo + Fito		Endo + Fito 10d		Endo + Fito 12d	
		Tratamento	Controlo	Tratamento	Controlo	Tratamento	Controlo
Crescimento	Endo	0,17 \pm 0,02a	0,11 \pm 0,01b	2,3 \pm 0,09a	1,7 \pm 0,1b	1,34 \pm 0,6a	1,2 \pm 0,2a
	Fito	0,18 \pm 0,01a	0,14 \pm 0,01a	0,5 \pm 0,05a	0,6 \pm 0,05b	0,16 \pm 0,05a	0,24 \pm 0,07b
Esporulação	Endo	1,9 \pm 0,05a	1,6 \pm 0,2b	2,5 \pm 0,3a	1,9 \pm 0,3b	3,8 \pm 0,1a	2,8 \pm 0,2b
	Fito	0,8 \pm 0,05a	0,9 \pm 0,05b	0,9 \pm 0,1a	1,1 \pm 0,1b	0,3 \pm 0,0a	0,5 \pm 0,0b
Germinação	Endo	84 \pm 3,1a	74 \pm 1,3b	88 \pm 2,7a	80 \pm 3,2b	96 \pm 1,9a	83 \pm 2,8b
	Fito	25 \pm 2,0a	27 \pm 2,7a	14 \pm 1,6a	29 \pm 4,3b	7 \pm 1,6a	23 \pm 1,7b

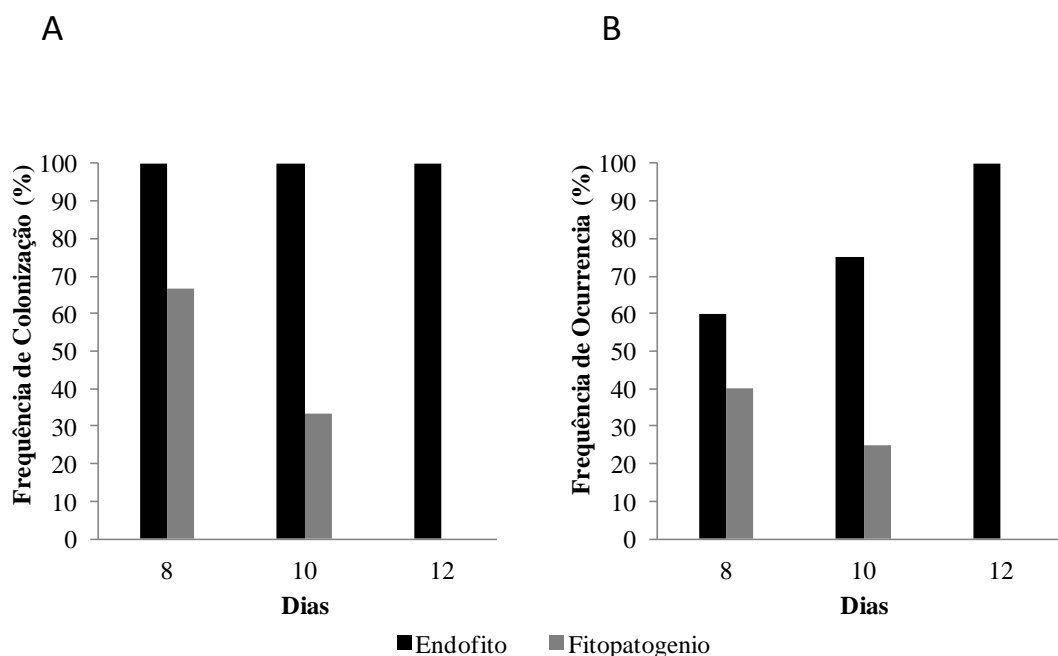


Figura 1- (A) Frequência de colonização e (B) Frequência de ocorrência de *C. acutatum* e *P. commune* nos segmentos foliares de oliveira quando inoculados em simultâneo (End + Fito), ao longo de 12 dias de co-cultura.