



Avaliação da atividade entomopatogênica de linhagens fúngicas dos gêneros *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium* e *Trichoderma*

Palavras-Chave: Agronegócio, Agricultura Sustentável, Coleções microbianas

Autores(as):

Stella Pinheiro Grandin, CPQBA - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Derlene Attili de Angelis, CPQBA - UNICAMP

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, com destaque para os cultivos de soja, milho, cana-de-açúcar e algodão. Em 2022, um dos grandes desafios do produtor agrícola foi manter a rentabilidade do negócio, que traz divisas e gera muitos empregos para o país. Visando diminuir danos causados por diversos tipos de pragas e doenças, o agronegócio investe em insumos como fertilizantes, agrotóxicos, pesticidas e outros.

Para cumprir com um dos objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU da agenda 2030, pesquisadores têm buscado o desenvolvimento de métodos menos agressivos à natureza, fazendo uso de insumos biológicos como biofertilizantes, bioestimulantes e biocontroladores de pragas. Nesse processo, a aplicação de fungos filamentosos para o controle de entomoparasitas e fitopatógenos constitui uma alternativa extremamente interessante, viável e ambientalmente desejada.

Nesse cenário, o presente trabalho se propôs a selecionar cepas fúngicas de gêneros reconhecidamente entomopatogênicos, como *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria*, além de espécies de *Trichoderma*, também relatados no meio científico pela capacidade de produzir quitinases. Para verificar se essas cepas seriam boas candidatas para utilização contra insetos-praga na agricultura, foram realizadas avaliações da produção de quitinases, por meio da incubação das cepas em meio de cultura contendo quitina como fonte de carbono e posterior medição do halo de degradação para quantificação da produtividade. Para agregar valor à bioprospecção de cepas para este fim, foi também realizada a curadoria desses isolados por identificação morfológica e molecular, com posterior preservação pelos métodos de Castellani (manutenção em água) e ultracongelamento -80°C.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de isolados fúngicos para controle de insetos-praga e como antagonistas ao agente da antracnose, buscando estruturar uma coleção de culturas microbianas de interesse para o agronegócio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a viabilidade e pureza de isolados dos gêneros *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium* e *Trichoderma*.
2. Avaliar qualitativamente a produção de quitinase de isolados dos gêneros *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium* e *Trichoderma*;
3. Identificar os isolados promissores por caracterização morfológica e molecular.
4. Depositar os isolados promissores e agregar as informações obtidas sobre as atividades investigadas, junto à Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, CBMAI/ Unicamp.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Checagem da viabilidade e da pureza
2. Preservação dos isolados
3. Avaliação Qualitativa da Produção de Quitinases
4. Caracterização molecular
 - a. Extração de DNA;

- b. PCR e Purificação;
- c. Reação de Sequenciamento;
- d. Análise Filogenética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolados fúngicos

Os isolados utilizados para verificação da otimização do meio de cultura foram recebidos em placas de Petri em triplicata da empresa B Plant e previamente identificados a nível de espécie pela empresa. São eles: CCT 8044: *B. bassiana* ; CCT 8127: *I. javanica* ; CCT 8048: *M. anisopliae* ; CCT 8052: *T. harzianum*.

Checagem da Viabilidade e da Pureza

Os isolados foram repicados a partir de culturas pré-existentes em meio MA 2%, e incubados a 28°C por 7 dias. A macroscopia dos fungos foi observada em estereoscópio para confirmação da morfologia e pode ser observada nas imagens a seguir:



Figura 1: Cepa CCT 8044

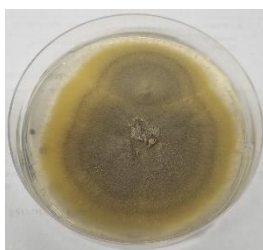


Figura 2: Cepa CCT 8048

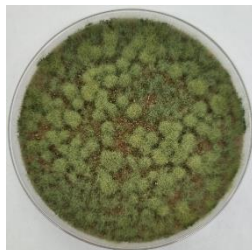


Figura 3: Cepa CCT 8052



Figura 4: Cepa CCT 8127

Foi também realizado um microcultivo para cada fungo, permitindo a observação em lâmina de suas características.

Preservação dos isolados

A preservação dos isolados foi feita por dois métodos. O primeiro foi o método de Castellani (CAPRILES, MATA, MIDDELEN, 1989), que constitui o acervo de trabalho. Depois, foi feito o congelamento a -80°C, em que, a partir da cultura saudável, foi feita uma suspensão celular em solução de glicerol 20% esterilizado, com auxílio de uma alça de inoculação, que é então homogeneizada e distribuída em alíquotas de 1mL, em tubos criogênicos, deixados a -20°C por 20 min, e então transferidos para caixas armazenadoras, a -80°C.

Avaliação qualitativa da produção de quitinases

O primeiro ensaio de avaliação da produção de quitinases foi feito utilizando o protocolo de preparação da quitina coloidal segundo Joe e Sarojini, 2017. O meio de cultivo utilizado foi Quitina Ágar, contendo: 15 g ágar, 3 gL⁻¹ quitina coloidal, 2 gL⁻¹ (NH₄)₂ SO₄, 1,1 gL⁻¹ Na₂HPO₄, 0,7 gL⁻¹ KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, 1 mg L⁻¹ FeSO₄, 1 mg L⁻¹ MnSO₄, 1L água destilada, pH 5.8 (Baldoni, 2016). Então, um bloco contendo a colônia fúngica, retirado da placa de Petri com auxílio de um canudo autoclavado com 5 mm de diâmetro, foi inoculado no meio de cultura de quitina, para então ser incubado a 28°C por 15 dias, quando a produção de quitinase foi medida pela formação de um halo de degradação, causado pela hidrólise da quitina coloidal, que foi preparada segundo Joe e Sarojini, 2017.

Após 15 dias de incubação, foi observado o crescimento de todas as cepas. As imagens abaixo mostram uma das réplicas de cada cepa incubada no meio com quitina. O contraste, a saturação e a definição das imagens foram alterados para facilitar a visualização dos halos de degradação.

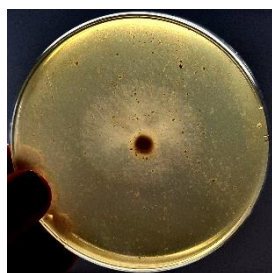


Figura 5: CCT 8044



Figura 6: CCT 8048



Figura 7: CCT 8127



Figura 8: CCT 8052

Como pode-se observar nas imagens acima, todas as cepas testadas apresentaram screening positivo para a atividade de quitinase. As cepas CCT 8044, CCT 8048 e CCT 8127 formaram halos de degradação de fato, enquanto a cepa CCT 8052, *T. harzianum*, formou um fino micélio que ocupou toda a placa e esporulou nas margens da placa, onde havia mais ar disponível. De toda forma, os 4 fungos definitivamente apresentam produção de quitinase elevada para conseguir crescer em um meio em que a única fonte de carbono disponível era a quitina. Entretanto, devido a não utilização de um corante, não foi possível observar claramente os limites tanto do halo de degradação quanto da colônia, impossibilitando o cálculo do Índice Enzimático: IE = média do diâmetro dos halos (ϕ h) dividido pela média do diâmetro das colônias (ϕ h) (Bezerra, 2017).

Dessa forma, foram planejados dois outros ensaios de avaliação da produção de quitinases utilizando dois novos protocolos. O segundo ensaio de avaliação da produção de quitinases está sendo feito segundo Vasquez et al., 2021, tanto para a produção de quitina coloidal quanto para o preparo do meio de cultivo. O terceiro ensaio está utilizando o mesmo protocolo de produção de quitina coloidal de Vasquez et al., 2021, mas, para o meio de cultivo, está sendo utilizado o meio de cultivo descrito em Tolosa et al., 2022. Os resultados desses ensaios serão apresentados no congresso, junto com o resto do projeto.

Caracterização molecular

Extração do DNA

O DNA dos 4 fungos foi extraído por método de extração do DNA genômico com fenol. O produto obtido foi corrido em eletroforese em gel de agarose para avaliação do sucesso do procedimento. As bandas de DNA estavam boas, mas havia bastante resquício de RNA, o que exigiu uma digestão com RNase. Feito isso, foi realizada uma nova corrida em gel de agarose, que mostrou que a digestão foi bem-sucedida.

PCR e Purificação

Foi realizada a reação de PCR das amostras de DNA extraído, utilizando os primers ITS 1 e ITS 4. Após a PCR, foi realizada uma nova corrida em gel de agarose para verificar o sucesso da reação. A imagem produzida foi a seguinte:

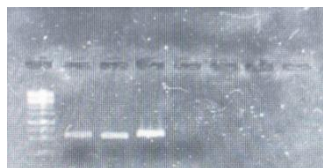


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR.



Figura 10: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da purificação das PCRs.

Como visto na imagem 9, a PCR foi bem-sucedida para 3 amostras. A amostra que faltava foi amplificada em uma segunda PCR com sucesso. Todas as 4 amostras foram então purificadas com o kit de purificação de produtos de PCR Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Os produtos da purificação foram corridos em eletroforese para verificação do sucesso do procedimento.

A eletroforese foi realizada pela aluna juntamente com outras amostras de outros pesquisadores do laboratório. As bandas referentes às amostras da aluna são as 4 primeiras da imagem 10, que estão bem marcadas e indicam uma purificação bem-sucedida. Assim sendo, foi realizada a reação de sequenciamento, com os primers ITS 1 e ITS 4, seguida da precipitação da reação de sequenciamento. Depois, a placa de 96 poços contendo as amostras foi colocada no sequenciador ABI 3500XL (Applied Biosystems).

Reação de Sequenciamento e Análise Filogenética

Após o sequenciamento, foram gerados arquivos contendo o eletroferograma obtido de cada fita do DNA de cada amostra, que podem ser lidos no programa Bioedit. Por meio do Bioedit, foi possível realizar o alinhamento das sequências referentes ao ITS1 e ao ITS4, de modo a gerar uma fita consensus para cada amostra. Com a sequência obtida, foi feita uma comparação com a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para investigar com qual microrganismo há maior similaridade genética. A partir disso, foi feito um levantamento de dados na literatura para buscar uma filogenia recente e confiável que mostrasse a espécie encontrada no NCBI assim como as espécies mais filogeneticamente próximas a ela. Então, as sequências da região ITS de cada espécie escolhida foram anotadas e abertas no Bioedit, juntamente com a sequência da amostra a ser investigada, e foi realizado um novo alinhamento múltiplo. Esse alinhamento foi salvo e aberto no programa Mega X, onde foi selecionada a ação “Construct neighbor-joining tree”, contando com o método de teste de Bootstrap de 1000 replicações. Assim, foi obtida a árvore filogenética final.

O passo-a-passo da construção das árvores para cada amostra é mostrado a seguir: 1. Obtenção da sequência consenso por meio do alinhamento dos eletroferogramas das duas fitas ITS1 e ITS4 no Bioedit; 2. Pesquisa da sequência no NCBI para investigação de qual espécie provavelmente é; 3. Levantamento de literatura para encontrar uma filogenia confiável do gênero encontrado no passo 2; 4. Escolha das espécies cuja sequência da região ITS será utilizada para construir a árvore filogenética e 5. Construção da árvore filogenética no programa Mega X. Abaixo, são mostradas as árvores filogenéticas construídas para cada cepa.

Árvores Filogenéticas

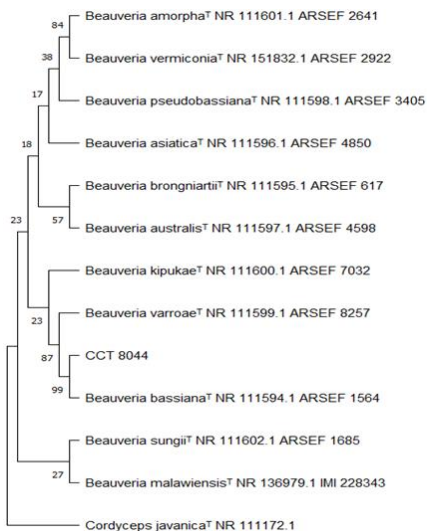


Figura 11: Árvore filogenética da cepa CCT 8044 construída pela aluna usando o programa Mega X

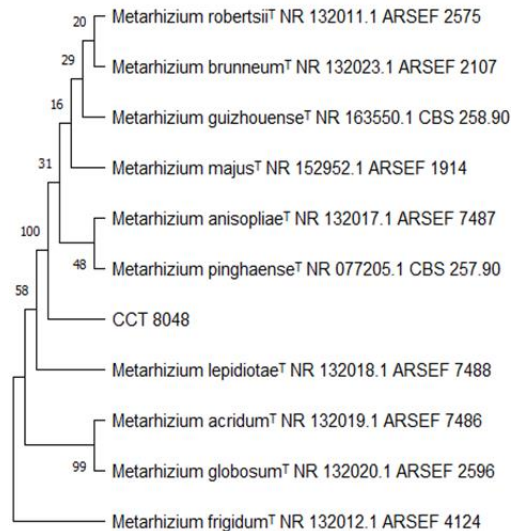


Figura 12: Árvore filogenética da cepa CCT 8048 construída pela aluna usando o programa Mega X

O teste de Bootstrap avalia o nível de confiança que podemos ter em uma filogenia molecular, apresentando uma porcentagem que mostra a confiabilidade que se pode ter em cada nó na filogenia (CALDART et al, 2016). No caso da amostra CCT 8044, o teste de bootstrap (figura 11) mostrou que, em 99% das vezes em que o programa construiu aquela árvore, ocorreu o mesmo nó que agrupa a amostra com a espécie *Beauveria bassiana*. Isso confere uma confiança alta de que a amostra em questão de fato pertence àquela espécie.

Como é possível observar na árvore da figura 12, a cepa CCT 8048 não foi agrupada com nenhuma espécie considerada na filogenia, o que significa que a região ITS não é conclusiva para definir o parentesco entre essas linhagens. Por isso, tornou-se necessário buscar outro par de primers com base na literatura mais recente que pudesse ser utilizado para o gênero *Metarhizium*. Após pesquisa, encontrou-se o par de primers FRPB2-5f e RPB2-7cR, referentes ao gene RPB2 - RNA polimerase II (LOPES et al, 2018).

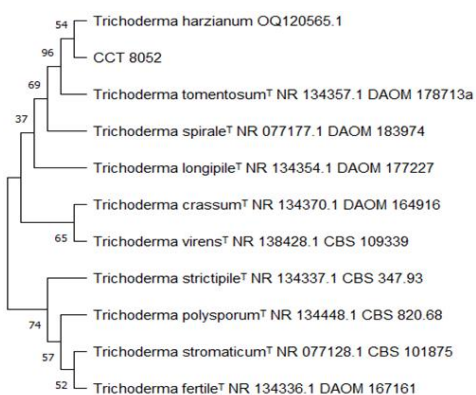


Figura 13: Árvore filogenética da cepa CCT 8052 construída pela aluna usando o programa Mega X

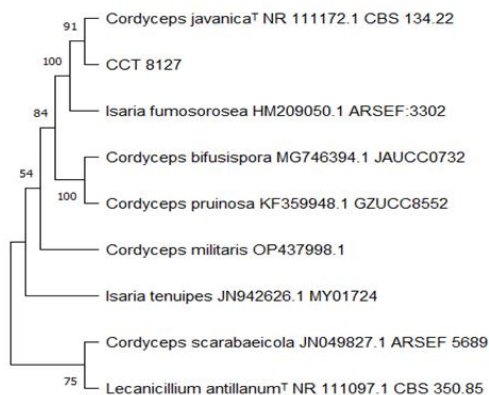


Figura 14: Árvore filogenética da cepa CCT 8127 construída pela aluna usando o programa Mega X

Na filogenia da figura 13, podemos observar que, apesar de a cepa CCT 8052 ter sido identificada como *Trichoderma harzianum*, o valor do teste de bootstrap foi muito baixo (54%), o que não é ideal. Dessa forma, escolheu-se repetir o

sequenciamento utilizando outro par de primers que seja mais seletivo para o complexo *harzianum*. Na literatura, foram encontrados os primers EF-728M e TEF-1R referentes ao gene TEF1- fator de elongação 1 alfa (CHAVERRI et al, 2015).

O teste de bootstrap da figura 14 demonstrou que, em 91% das vezes que a árvore acima foi construída, a linhagem CCT 8127 foi agrupada como *Cordyceps javanica*. Esse é um valor aceitável que permite afirmar com certa confiança a espécie da cepa em questão.

Conclusões

As quatro cepas estudadas possuem alta produção de quitinases, quando crescidas em um meio contendo apenas quitina como fonte de carbono, o que é indicativo de que são boas candidatas para utilização contra insetos-praga como fungos entomopatogênicos. A partir do teste realizado, foi possível observar que a cepa CCT 8052 é a que possui maior produção dessa enzima, seguida da cepa CCT 8127, depois a cepa CCT 8044 e, por último, a cepa CCT 8048. Novos ensaios de avaliação da produção de quitinases tornam-se necessários para quantificar mais precisamente o índice enzimático de quitinase para essas cepas.

Referências Bibliográficas

- AAMIR, S.; SUTAR, S.; SINGH, S.K.; BAGHELA, A. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. **Plant Pathology & Quarantine**, v. 5, n. 2, p. 74–81, 2015. DOI:10.5943/ppq/5/2/6.
- ASAFF, T.A.; REYES, V.Y.; LOPEZ, L.V.E.; De la TORRE, M.M. Guerra entre insetos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. **Avance y Perspectiva**, v.21, p. 291-295, 2002.
- BADALYAN, S.M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol. Mediterr.**, 2002.
- CROUS, P.W.; VERKLEIJ, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; HOUBRAKEN, J. Westerdijk Laboratory Manual Series No. 1. Fungal Biodiversity. **Webmaster Laboratory Manual Series**, 425pg, 2019.
- CRUZ, I.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Pragas da fase vegetativa e reprodutiva do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA MILHO E SORGO, 2006. (Documento Técnico).
- GARCIA GUTIÉRREZ, C.; GONZÁLEZ MALDONADO, M.B. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. **Ra Ximhai**, v. 6, n.1, p.17- 22, 2010.
- HARTUNG, C.C.; MATA S.; MIDLVEEN M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**. 1989 May; 106(2):73-9. doi: 10.1007/BF00437084. PMID: 2797113.
- MORA, M.A.E.; CASTILHO, A.M.C.; FRAGA, M.E. Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.18, n.3, p.335-349, 2016.
- THOMAZONI, D.; FORMENTINI, A.; ALVES, L.F.A. Patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos à *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Agricultural Entomology**, Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.2, p. 126-133, 2014.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., **PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications**, Academic Press, San Diego, 315-322. 1990. DOI: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.
- BALDONI, D. B. Prospecção de chitinolytic fungi and chitinase production in solid state fermentation. **Manancial: Repositório Digital da UFSM**, 2016.
- LIU, C. L.; LAN, C. Y.; FU, C. C.; JUANG, R. S. Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*. **Int J Biol Macromol**, 2014.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; TRAUTE-HEIDI, A.. **Compendium of soil fungi**. Academic Press. 1980.
- Caldart, E. T., Mata, H., Canal, C. W., & Ravazzolo, A. P. (2016). Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, 44, 1-20.
- Rogério B. Lopes, Daniela A. Souza, Luiz F.N. Rocha, Cristian Montalva, Christian Luz, Richard A. Humber, Marcos Faria, *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of Invertebrate Pathology**, Volume 151, 2018, Pages 165-168, ISSN 0022-2011, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.12.001>.
- ALVES, S.B.; Lopes, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414p.
- AGOSTINI, T. et al. Eficiência de fungos entomopatogênicos para o controle de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório. **Comunicata Scientiae**. 6. 90-96. 2015.
- BALDONI, D. B.. Prospecção de fungos para produção de quitinases por fermentação em estado sólido. **Manancial: Repositório Digital da UFSM**, 2016.
- BRIDGE, P.D.; WILLIAMS, M. A. J.; PRIOR, C.; PATERSON, R. R. M. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Microbiology Society**. v. 139, n.6. 1993.
- DOU K., et al. A novel polyphasic identification system for genus *Trichoderma*. **BioRxiv**. 2018.
- CHAVERRI P., BRANCO-ROCHA F., JAKLITSCH W., GAZIS R., DEGENKOLB T., SAMUELS G.J.. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**. 2015.
- LOPES, R. S. et al. Controle biológico e alternativo de *Dactylopius opuntiae* por fungo entomopatogênico e extratos vegetais em plantação de *Opuntia ficus-indica* (Pernambuco-Brasil). **Revista Pesquisa Agropecuária**. v. 23, n. 21, p. 1-4. 2018.
- MEDEIROS, G. D. et al. Identificação e controle de fungos entomopatogênicos presentes em uma coleção entomológica. **Revista Multitemas**. n. 35, p.179-188, 2007.
- MOREIRA, F. J. C. et al. Controle de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera Curculionidae) com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em banana. **Revista Verde**. v. 12, n.3, p.366-373, 2017.
- STURMER, A. T. et al. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Ciências Biológicas da Saúde**. v. 6, n. 1, p. 85-88, 2004.
- DE FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P.. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**. n. 22, 2001.
- TIAGO P. V., DE OLIVEIRA N. T., DE LUNA E. Á., LIMA A. (2014). Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**. 44, 645–651. 2014.
- LOPES, R. S.; SVEDESE, V. M.; PORTELA, A. P. A. S.; ALBUQUERQUE, A. C., LIMA, E. A. L. A.. Virulência e aspectos biológicos de *Isaria javanica* (Frieder & Bally)
- Samson & Hywell-Jones sobre *Coptotermes Gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). **Vetindex**. v. 78, n.4. 2011.
- ZHAO, Q.; YE, L.; WANG, Z.; LI, Y.; ZHANG, Y.; KEYHANI, N. O.; HUANG, Z.. Controle sustentável da praga do arroz, *Nilaparvata lugens*, usando o fungo entomopatogênico *Isaria javanica*. **Pest Management Science**. v. 77, n. 3. 2020.
- MONDAL et al. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. **The Pacific Review A: Natural Science and Engineering**. 2016.
- Shah, P.A., Pell, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Appl Microbiol Biotechnol** 61, 413–423 (2003).
- KIDANU, Sisay; HAGOS, Legese. Research and application of entomopathogenic fungi as pest management option: a review. **Journal of Environment and Earth Science**, v. 10, n. 3, p. 31-39, 2020.
- MEYLING, Nicolai V.; EILENBERG, Jørgen. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 113, n. 1-4, p. 336-341, 2006.
- MORA, Margy A. Esparza; CASTILHO, Alzimiro M. Contreiro; FRAGA, Marcelo E. Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Rev Bras Prod Agroind**, v. 18, p. 335-49, 2016.
- WANG, J. B.; LEGER, RJ St; WANG, C. Advances in genomics of entomopathogenic fungi. **Advances in genetics**, v. 94, p. 67-105, 2016.
- MAINA, U. M. et al. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. **J. Entomol. Zool. Stud**, v. 6, n. 1, p. 27-32, 2018.
- VEGA, Fernando E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **fungus ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.
- JABER, Lara R.; OWNLEY, Bonnie H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. **Biological control**, v. 116, p. 36-45, 2018.
- LEE, Yong-Seong; KIM, Young Cheol. Tobacco growth promotion by the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica* pf185. **Mycobiology**, v. 47, n. 1, p. 126-133, 2019.
- JOE, Shaun; SAROJINI, Suma. An efficient method of production of colloidal chitin for enumeration of chitinase producing bacteria. **Journal of Sciences**, v. 4, n. 16, p. 37-45, 2017.
- VASQUEZ, Yesenia Melissa Santa-Cruz et al. Cold-adapted chitinases from Antarctic bacteria: taxonomic assessment and enzyme production optimization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102029, 2021.
- TOLOSA, R. dos S.; SILVA, I. J. S. da; SOUZA, T. M. de; CRUZ, J. C. da; SILVA, G. F. da. Seleção e identificação de bactérias quitinolíticas isoladas dos rios amazônicos: diversidade e perspectivas. 2022.