

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS POR UM MUTANTE DE *Talaromyces flavus* E SEUS EFEITOS EM FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

ERI SATO SAITO e ITAMAR S. MELO

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, CNPMA/EMBRAPA,
Cx. Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP

ABSTRACT

Metabolite Production by a Mutant of *Talaromyces flavus* and its Effect on Phytopathogenic Fungi

One new mutant, T4, from *Talaromyces flavus* isolated through UV light has shown to produce a potent metabolite that inhibits the mycelial growth of the phytopathogenic fungi: *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *F. solani* f.sp. *phaseoli*. The metabolite at 1:100 dilution completely inhibited the sclerotia germination of *S. rolfsii*. The wild-type IK also inhibited, although weakly, the mycelial growth of those fungi.

Key words: *Talaromyces flavus*, metabolite, phytopathogenic fungi.

RESUMO

Metabólitos de uma linhagem mutante de *Talaromyces flavus*, mostraram ter um potente efeito inibitório sobre o crescimento micelial dos seguintes fungos fitopatogênicos: *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. Os metabólitos, mesmo diluído 100 vezes, inibiram completamente a germinação de escleródios de *S. rolfsii*. A linhagem parenteral IK também inibiu o crescimento micelial daqueles fungos numa menor extensão.

Palavras-chave: *Talaromyces flavus*, metabólito, fungos fitopatogênicos.

INTRODUÇÃO

Talaromyces flavus (Klocker) Stolk & Samson (Anamorfo de *Penicillium vermiculatum*) é um potencial agente de controle de fungos fitopa-

togênicos importantes, entre os quais *Verticillium dahliae* (Marois *et al.*, 1982), *Sclerotinia sclerotiorum* (McLaren *et al.*, 1986), *Rhizoctonia solani* (Boosalis, 1956). (*Nagtzaam, 1995). Apesar de pesquisas intensivas sobre a capacidade de *T. flavus* em reduzir a incidência de doenças causadas por patógenos de solo, o mecanismo de controle não é claramente compreendido.

Os mecanismos envolvidos no controle biológico por este fungo são antibiose, competição e

Recebido em 11 de maio de 1995

Aceito em 3 de março de 1997

Distribuído em 31 de maio de 1997

Correspondência para: Itamar S. Melo

e-mail: itamar@cnpma.embrapa.br

micoparasitismo. O sucesso do antagonismo pode ser atribuído à uma combinação destes modos de ação.

Talaromyces flavus produz um antibiótico, o talaron com forte atividade antifúngica, bacteriana e com atividade contra protozoários (Mizuno *et al.*, 1974 e Kim *et al.*, 1986). Fravel *et al.* (1987) relataram que este metabólito causa a inibição do crescimento micelial de *V. dahliae* e mata seus microescleródios. Este composto, assim identificado, resultante da reação de glucose oxidase (B-D-glucose oxigênio redutase) (Kim *et al.*, 1988), catalisa a oxidação de glucose à gluconato e peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio molecular. O fungo também produz outros tipos de antibióticos, quais sejam vermicilina, vermiculina, vermistatina e ácido-2-metil sórbico (Fuska *et al.*, 1972, 1979; Proska *et al.*, 1992).

Neste trabalho apresentamos resultados da produção de metabólitos por duas linhagens de *T. flavus*, uma selvagem e outra, um mutante proveniente daquela, e seus efeitos no crescimento de fitopatógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungo: Duas linhagens de *Talaromyces flavus* foram utilizadas neste trabalho; uma selvagem (IK) proveniente do International Mycological Institute, Inglaterra e outra um mutante (T4) proveniente da linhagem IK obtido através de irradiação com luz ultra violeta, por 1.8 minutos, de ondas curtas (5 joules/m²/s), usando-se uma lâmpada Mineralight, modelo UVSL-25, 115 volts, 60 H, 0.16 amps, no escuro. Para isto empregou-se um tempo de irradiação capaz de matar 95% dos conídios. Este tempo de irradiação foi obtido após um teste preliminar para determinar a curva de sobrevivência dos conídios.

Produção de metabólito: O fungo foi mantido em BDA (batata-dextrose-agar) e para produção do metabólito utilizou-se o meio líquido BD em erlenmeyers de 1000 ml contendo 350 ml de meio. As culturas foram incubadas à 28°C por 7 dias em agitador (120 rpm). Após este período procedeu-se a filtração para separação da biomassa, o sobrenadante foi extraído com acetona em baixa temperatura, e logo em seguida com acetato de etila para estudo da sua atividade biológica contra os seguintes fungos: *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia*

solani, *Sclerotinia sclerotiorum* e *F. solani* f.sp. *phaseoli*.

Ensaio experimental: Os ensaios foram realizados em placas de Petri contendo BDA, inoculando-se os patógenos a 1 cm das bordas e simultaneamente pipetando-se sobre os discos de antibióticos 5 µl do metabólito concentrado em rotavapor e/ou este diluído em acetato de etila. Os discos foram posicionados a 1 cm da outra borda de cada placa. As avaliações do crescimento micelial foram efetuadas quando o crescimento dos fungos nos tratamentos controle atingiu todo o diâmetro da placa que, aconteceu em tempos diferenciados para determinados patógenos. Os efeitos dos metabólitos também foram testados sobre a germinação dos escleródios de *Sclerotium rolfsii*, um patógeno de culturas de importância agrícola. Escleródios de 10 dias de idade foram imersos por 15 minutos no metabólito e após este tempo os escleródios foram enxaguados em água destilada esterilizada, secos em papel de filtro e plaqueados em meio Ágar-água. Observação da germinação foi efetuada com auxílio de um microscópio este-reoscópio.

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. O ensaio foi repetido duas vezes.

Caracterização cultural e morfológica: Tanto o mutante quanto a linhagem selvagem foram cultivados em BDA a fim de se observar seus padrões de crescimento micelial e esporulação. Discos de meio de cultura contendo micélio e conídios com 0,7 cm de diâmetro, foram retirados das margens de colônias de 14 dias e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA. Foram determinados o diâmetro das colônias e esporulação após 14 dias de incubação a 25°C sob luz fluorescente contínua. O delineamento foi em blocos ao acaso com três repetições. Este ensaio foi repetido duas vezes.

O tamanho (comprimento e largura) dos conídios das duas linhagens foi medido através de observações microscópicas com auxílio de uma ocular micrométrica (100 conídios de cada linhagem, cultivados em meio BDA por 14 dias).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detectaram-se diferenças quanto ao efeito dos metabólitos produzidos pelas linhagens de *T. flavus* bem como sensibilidade dos patógenos à

TABELA I

Espectro de ação de metabólitos de *Talaromyces flavus*, IK e T4, na inibição do crescimento micelial.

Patógenos	% de inibição de crescimento micelial	
	IK	T4
<i>Sclerotium rolfisii</i>	21.79 bA	52.25 aA
<i>Fusarium solani</i>	16.00 aAB	49.11 aB
<i>Verticillium dahliae</i>	19.90 bAB	29.27 aA
<i>Rhizoctonia solani</i>	6.44 bBC	29.10 aB
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5.09 bBC	20.68 aB
<i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	0.00 bC	20.50 aB

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si, para comparação entre patógenos dentro de *Talaromyces*. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si para comparação de *Talaromyces* dentro de patógenos. D.M.S. 1% = 13.32022

estas substâncias, mostrando que ocorrem variações quantitativas e qualitativa (Tab. I).

Estes metabólitos apresentam ponto de fusão característicos, T4 = 22,8212°C e IK = 21,7748°C, sendo termolábeis e, portanto, mantidos sobre refrigeração para os bioensaios.

O mutante T4, de cor branco cotonoso, apresenta estabilidade genética e taxa de crescimento, tanto em meio sólido como em meio líquido, superior à linhagem parental. Outros mutantes provenientes da linhagem IK foram obtidos, porém sem nenhum efeito sobre estes organismos testes. Esta mesma linhagem além de apresentar potente efeito antibiótico apresenta crescimento rápido em BDA.

A linhagem mutante T4 exerceu um potente efeito inibitório em fungos fitopatogênicos estudados, em comparação com a linhagem parental. *Sclerotium rolfisii* foi o fungo mais sensível aos metabólitos produzidos pelas linhagens.

Além da inibição do crescimento micelial de fitopatógenos foi estudado também o efeito de metabólitos na germinação de escleródios de *S. rolfisii* (Tab. II).

Verificou-se que a germinação de escleródios foi totalmente reduzida, mesmo com 1% de concentração do "pool" de antibióticos e enzimas, não purificados da linhagem T4.

A mutação afetou, provavelmente, os genes que codificam à produção de antibióticos e enzimas como observado por Madi *et al.* (1992). Es-

TABELA II

Inibição da germinação de escleródios de *S. rolfisii* por metabólitos tóxicos das linhagens de *Talaromyces flavus*, linhagens IK e T4.

Concentração de metabólitos (%)	% de germinação de escleródios de <i>S. rolfisii</i>		
	T4	IK	acetato de etila
100.0	0.0	0.0	100.0
50.0	0.0	0.0	100.0
10.0	0.0	0.0	100.0
1.0	0.0	100.0	100.0
0.1	100.0	100.0	100.0
0.0	100.0	100.0	100.0

tes, estudando a herança das propriedades de antagonismo e atividade de enzimas líticas e antibióticos contra *V. dahliae* e *Sclerotium rolfisii*, notaram que as variações quantitativas em cada uma das enzimas envolvidas no controle de fitopatógenos, é provavelmente, governada por alguns genes estruturais e vários genes controladores.

A linhagem T4 inibiu a germinação de escleródios de *Sclerotium rolfisii* em concentração menor se comparada a IK, esta diferença pode ser atribuída ao conjunto de antibióticos e enzimas produzidas pela mesma, variando em proporção e/ou estrutura química.

Os metabólitos produzidos pela linhagem T4, efetiva em inibir os patógenos, poderiam ser fracionados, suas estruturas moleculares determinadas, e propiciar um modelo de síntese para melhores fungicidas ou selecionados como reguladores de crescimento de plantas.

A produção de antibióticos pode ser melhorada através de técnicas clássicas de genética, como a indução de mutação e seleção, aumentando, portanto, a variabilidade genética e as chances de se obter linhagens melhoradas com potencial de controle de doenças de plantas.

TABELA III

Crescimento e esporulação de *Talaromyces flavus*, linhagens IK (selvagem) e T4 (mutante) em meio BDA.

Linhagens	Crescimento micelial (cm)	Esporulação (x10 ⁴ conídios/ml)
T4	8.00 A	0,750 A
IK	3.76 B	1,750 B

Médias seguidas das letras diferentes diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A linhagem mutante, T4 apresentou um rápido crescimento micelial, atingindo toda a placa já no 7º dia de incubação, ao passo que a linhagem selvagem apresentou um crescimento mais lento. Por outro lado, esta apresenta uma boa taxa de esporulação. Em condições de solo natural (não autoclavado), o mutante T4, quando inoculado em plantas de berinjela e com solo infestado artificialmente com o patógeno *Verticillium dahliae*, apresentou melhor controle da doença do que a linhagem selvagem (dados não mostrados).

Um excelente agente de biocontrole deve crescer rapidamente e produzir substâncias, como antibióticos e enzimas, em nível que impeça o crescimento de fitopatógenos de solo na rizosfera das plantas esta característica foi obtida para este mutante, T4, de *T. flavus*.

O mutante T4 apresenta conídios (1,016 µm de comprimento e 1,024 µm de largura) menores do que a linhagem selvagem (2,012 µm comprimento × 1,082 µm largura) mostrando que podem ocorrer variações quando adotado este procedimento para o melhoramento.

CONCLUSÕES

— Os metabólitos produzidos pela linhagem T4 (mutante) apresentam amplo espectro de ação e são melhores que o selvagem para inibir os patógenos *Sclerotium rolfisii*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* quando o parâmetro avaliado foi a % de inibição de crescimento micelial.

— Os metabólitos produzidos por T4 inibem a germinação de escleródios de *Sclerotium rolfisii* à uma concentração menor se comparado ao IK (selvagem), sendo portanto, promissores para controlar esta estrutura de resistência.

Nota — E. S. Saito é pós-graduando da UNESP, Campus de Rio Claro, SP. I. S. Melo é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOOSALIS, M., 1956, Effect of soil temperature and Green-Manure amendment of unsterilized soil on parasitism of *Rhizoctonia solani* by *Penicillium vermiculatum* and *Trichoderma* sp. *Phytopathology*, 46: 473-477.
- FRAVEL, D. R., KIM, K. K. & PAPAVIDAS, G. C., 1987, Viability of microesclerodia of *Verticillium dahliae* reduced by a metabolite produced by *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, 77: 616-619.
- FUSKA, J., FUSKOVA, A. & NEMEC, P., 1979, Vermistatin, an antibiotic with cytotoxic effects produced from *Penicillium vermiculatum*. *Biologia* (Bratislava), 34: 735-740.
- FUSKA, J., NEMEC, P. & KUHR, I., 1972, Vermiculine, a new antiprotozoal antibiotic from *Penicillium vermiculatum*. *J. Antibiotics*, 25: 208-211.
- KIM, K. K., FRAVEL, D. R. & PAPAVIDAS, G. C., 1986, A novel metabolite from the culture filtrate of *Talaromyces flavus* (resumo). *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, 45: 1796.
- KIM, K. K., FRAVEL, D. R. & PAPAVIDAS, G. C., 1988, Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 78: 488-492.
- MADI, L., KATAN, T. & HENIS, Y., 1992, Inheritance of antagonistic properties and lytic enzyme activities in sexual crosses of *Talaromyces flavus*. *Annals Applied Biol.*, 121: 565-576.
- MAROIS, J. J., JOHNSTON, S. A., DUNN, M. T. & PAPAVIDAS, G. C., 1982, Biological control of *Verticillium* wilt of Eggplant in the Field. *Plant Disease*, 66: 1166-1168.
- MCLAREN, D. L., HUANG, H. C. & RIMMER, 1986, Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. *Canadian J. Plant Pathol.*, 8: 43-48.
- MIZUNO, K., YAGI, A., TAKADA, M., MATSURA, K., YAMAGUCHI, K. & ASANO, K., 1974, A new antibiotic, Talaron. *J. Antibiotics*, 27: 560-563.
- NAGTZAAM, M. P., 1995, *Talaromyces flavus* as a potential biocontrol agent against *Verticillium dahliae* in potatoes. *Phytoparasitica*, 23(1): 69.
- PROSKA, B., ADAMCOVA, J. & FUSKA, J., 1992, 2-Methylsorbic acid, and antifungal metabolite of *Penicillium vermiculatum*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, 37: 443-445.