

Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos

Metodos usados no ...

2007

LV-2008.00018



CNPMA-7500-2



Embrapa



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Métodos usados no Biocontrole de Fitopatógenos

Editores:

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza
Itamar Soares de Melo

Bento Gonçalves, RS
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515
Caixa Postal 130
Fone: (0xx)54 3455 8000
Fax: (0xx)54 3451 2792
<http://www.cnpuv.embrapa.br>
sac@cnpuv.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Lucas da Ressurreição Garrido*
Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*
Membros: *Luiz Antenor Rizzon, Kátia Midori Hiwatashi, Osmar Nickel, Viviane Maria Zanella Bello Fialho*

Normalização bibliográfica: *Kátia Midori Hiwatashi*
Elaboração da capa: *Luciana Elena Mendonça Prado*

1ª edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Uva e Vinho

Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos/Editado por Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo. – Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007.

141 p.

ISBN 978-85-89921-05-3

1. Doença de planta. 2. Antagonismo. 3. Microrganismo. I. Valdebenito Sanhueza, Rosa Maria, ed. II. Melo, Itamar Soares de, ed.

CDD 579 (21. Ed.)

© Embrapa, 2007

Apresentação

Em consonância com a missão institucional da Embrapa Uva e Vinho, desde longa data vêm sendo desenvolvidas ações de pesquisa e desenvolvimento que têm gerado importantes resultados no tocante ao componente ambiental. E isto ocorre porque é comprovada a necessidade de buscar-se o desenvolvimento sustentado do espaço rural, tendo-se em vista as exigências de mercado, dos produtores e dos órgãos ambientais em reduzir-se o impacto ambiental da atividade produtiva.

É neste contexto que o controle biológico se insere. Ao maximizar o uso de organismos naturais no manejo de pragas e doenças, esta tecnologia contribui decisivamente para que a produção se dê com reduzido impacto, em benefício da almejada sustentabilidade. Esta publicação é resultante de estudos de pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho e de outras Unidades da Embrapa, além de essenciais parceiros, os quais, em parceria, têm contribuído para a melhoria do conhecimento sobre esta importante área.

Temos certeza que as informações aqui divulgadas servirão para o maior conhecimento e uso do controle biológico, bem como de estímulo e suporte para novas ações de pesquisa que resultem em tecnologias ambientalmente limpas e tecnicamente viáveis.

Alexandre Hoffmann
Chefe-Geral
Embrapa Uva e Vinho

Sumário

Isolamento de antagonistas a patógenos que colonizam ferimentos de plantas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	9
Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridões de pós-colheita <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	13
Isolamento de colonizadores de clamidosporos de <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	17
Isolamento de bactérias do rizoplano e endorizosfera e seu efeito na colonização de raízes e na promoção do crescimento de plantas <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	21
Isolamento de antagonistas para controle de doenças vasculares <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	27
Avaliação do efeito protetor e curativo de antagonistas a patógenos que colonizam folhas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, Margareth Zamboni-Pinotti e Ana Elisa Silveira Perez</i>	31
Multiplificação de <i>Clonostachys rosea</i> <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Gilberto Dall Onder</i>	35
Seleção de fungos endofíticos em fruteiras e flores <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Margareth Zamboni-Pinotti</i> ...	39
Isolamento seletivo de bactérias ativas para nucleação de gelo <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	43

Isolamento de fungos micorrízicos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	45
Isolamento seletivo de <i>Bacillus</i>	
<i>Wagner Bettiol</i>	49
Obtenção de mutantes e competitividade de isolados de bactérias resistentes a antibióticos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	53
Obtenção de mutantes de <i>Trichoderma</i> spp. resistentes a fungicidas	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	55
Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	59
Identificação de bactérias pelo sequenciamento de genes 16S ribossômico (16S rDNA)	
<i>Fernando Dini Andreote</i>	67
Identificação e diferenciação de linhagens de leveduras antagônicas a fitopatógenos utilizando sondas convencionais como indicadores na reação de polimerização em cadeia	
<i>Luis Fernando Revers e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	75
Produção de sideróforos por rizobactérias	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	79
Produção de antibióticos por microrganismos	
<i>Rosa T. S. Frighetto e Itamar Soares de Melo</i>	83

Produção de bactérias para uso no controle biológico	
<i>Deise Maria Fontana Capalbo</i>	97
Encapsulamento de microrganismos	
<i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	103
Roteiro para formulação experimental pó molhável de biopesticida (sigla internacional WP)	
<i>Cláudia Medugno</i>	109
Isolamento de actinomicetos visando ao controle biológico de fitopatógenos	
<i>Joelma Marcon, Jose Antonio da Silva e Maria Carolina Quecine</i> ...	117
Avaliação <i>in vitro</i> da colonização de raízes por rizobactérias	
<i>Brígida P. Vilar Queiroz e Itamar Soares de Melo</i>	121
Seleção de rizobactérias capazes de formarem biofilmes	
<i>Francisco Eduardo de C. Costa e Itamar Soares de Melo</i>	125
Avaliação ecotoxicológica de microrganismos em organismos não-alvo, organismos aquáticos e mamíferos	
<i>Vera Lúcia de Castro e Cláudio Jonsson</i>	129
Apêndice	
Meios de Cultura e Soluções	137

Produção de antibióticos por microrganismos

Rosa T. S. Frighetto¹
Itamar Soares de Melo²

A maioria dos microrganismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo. Muitos deles são organismos de crescimento lento. Actinomicetos, bactérias e fungos estão entre os produtores mais conhecidos. A vasta maioria de antibióticos em uso é produzida por actinomicetos e em particular por membros do gênero *Streptomyces*. Entre os fungos, *Penicillium* e *Cephalosporium* spp. são os mais conhecidos. Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são também estudadas como produtoras de potentes antibióticos, como *Bacillus colistinus*, produtor da colistina; *B. brevis* (tirotricina); *B. licheiniformis* (gramicidinas); *B. subtilis* var. *tracy* (bacitracina); *B. polymyxa* (polimixina), etc.

Alguns fungos agentes de biocontrole de doenças de plantas também atuam no controle, possivelmente, por produzirem substâncias antibióticas. Por exemplo, *Trichoderma* spp. produz 6-n-pentil-2H-pirano e tricodermina (um antibiótico terpenóide); *Talaromyces flavus* produz vermiculina, vermicilina, vermistatina e talaron. Somente o talaron tem sido relatado como antifúngico apresentando efeito sobre *Verticillium dahliae*.

Quando do isolamento de antagonistas, geralmente por facilidade de certas metodologias, testa-se *in vitro* a capacidade de antagonistas inibirem o crescimento, que se dá por metabólitos secundários, como antibióticos, sideróforos, etc. (HOMMA; SUZUI, 1989).

Um passo importante na busca de microrganismos produtores de antibióticos diz respeito ao isolamento seletivo em meios de cultivo apropriados, como também ao pré-tratamento do material para aumentar as chances de isolar o microrganismo desejado. Técnicas de enriquecimento de diferentes materiais têm sido freqüentemente usadas para diminuir o número de bactérias, quando se pretende isolar actinomicetos. Nesses casos, presume-se que muitos propágulos de actinomicetos, tanto esporos (*Streptomyces*) como fragmentos de hifas *Micrococcus rhodochrous* (antigo *Rhodococcus*), são mais resistentes do que células de bactérias gram-negativas.

¹ Química, Doutora, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

² Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

Técnicas de enriquecimento com nutrientes do material a ser utilizado no isolamento têm sido usadas rotineiramente. Adição ao solo de substratos sólidos, como quitina, favorece certos microrganismos quitinolíticos.

A literatura das últimas décadas traz numerosos exemplos de técnicas para isolamento seletivo de microrganismos, bem como para isolamento de metabólitos com atividade contra fitopatógenos.

São descritos nesse capítulo, protocolos básicos de extração de metabólitos de microrganismos e técnicas rotineiras para isolamento e identificação desses compostos.

Protocolo

Parte I – Produção de metabólitos livres de células

1. Preparar meio de cultivo líquido à base de batata-dextrose e verter 200 mL de meio em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade.
2. Colocar três discos de meio sólido de cultivo com crescimento pleno de, por exemplo, *Trichoderma* (linhagem produtora de pirona) em cada Erlenmeyer e incubar a 28°C por sete dias, sob agitação a 100 rpm.
3. Após este período, filtrar o conteúdo do frasco em papel de filtro (Whatman nº 4).
4. Em seguida, filtrar o sobrenadante sobre uma membrana filtrante esterilizada (0,22 µm), para se conseguir um filtrado livre de células.
5. O metabólito é testado contra alguns fungos-teste para verificar a atividade biológica do mesmo. Para tanto, cerca de 2 mL do filtrado esterilizado são transferidos para uma placa de Petri, que receberá em seguida 20 mL de BDA diluído. Agitar suavemente o meio fundente para que haja uma mistura uniforme com o metabólito.
6. Transferir um disco (5 mm de diâmetro) de meio com abundante crescimento do(s) patógeno(s) que se deseja controlar para o centro da placa. Fazer cerca de cinco repetições para cada tratamento.
7. Incubar as culturas até que se possa distinguir alguma diferença no crescimento dos organismos testes, quando comparado com o controle (placas sem o metabólito).

8. O crescimento do patógeno é medido periodicamente através do tamanho da colônia. No caso das bactérias, esse crescimento demora cerca de 48 a 72 horas, e no caso de fungos, cerca de 7 a 9 dias.
9. Caso o metabólito tenha algum efeito inibitório, proceder-se-á à extração do antibiótico com solventes apropriados (Parte II).

Esta etapa visa economizar material e tempo, evitando-se o procedimento de extração sem o conhecimento prévio sobre a capacidade de um dado organismo produzir ou não tais metabólitos. Esta fase é ideal para se fazer seleção de dezenas ou centenas de linhagens produtoras.

Parte II – Extração de antibióticos

1. Os processos empregados para extração de antibióticos são: a precipitação, a extração com solventes e a absorção por meio de resinas de troca iônica. A seguir, será exemplificada extração com solventes.

Cultura microbiana (seja ela fúngica ou bacteriana) crescida em meio líquido e filtrada sobre papel de filtro Whatman nº 4, é usada para extração. Cerca de 1 litro de sobrenadante já é suficiente. No caso de cultura bacteriana, é aconselhável proceder à centrifugação das células.

Em geral, para identificação de um composto ativo, maiores quantidades são necessárias.

2. Misturar ao filtrado cerca de 10-30% do volume de solventes orgânicos, geralmente, em ordem crescente de polaridade.

Esta metodologia consiste na separação das fases aquosa e orgânica.

Dividir o volume do filtrado para cada solvente a ser testado. Neste caso, seleciona-se aquele que melhor extrair o antibiótico. Para alguns organismos já se conhece o solvente mais apropriado. No caso de *Trichoderma*, o acetato de etila tem sido empregado (GHISALBERTI et al., 1990).

Os solventes mais empregados em extração de antibióticos são: os hidrocarbonetos (hexano, ciclohexano, éter de petróleo), os álcoois alifáticos (metanol, propanol, butanol), éster alifático (acetato de etila), e os halogenados (diclorometano, clorofórmio). A escolha do solvente é governada pelo coeficiente de partição do antibiótico entre o solvente e o filtrado, e pela miscibilidade do solvente com o filtrado.

3. Agitar em funil de separação e coletar a fase orgânica. Repetir a operação, pelo menos três vezes, aproveitando-se o filtrado que será extraído com nova quantidade do solvente.

4. A separação entre as duas fases pode ser facilitada pela adição de solução aquosa saturada de cloreto de sódio.
5. Devido à presença de umidade em solvente após a extração, secar com sulfato de sódio ou sulfato de magnésio anidros.
6. Filtrar sobre papel de filtro e remover o solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo, à temperatura abaixo de 45°C para evitar degradação de componentes termo-sensíveis.
7. Recolher o resíduo no fundo do balão, que no caso de *T. koningii* é um óleo de cor amarela a alaranjada, com o auxílio de uma pipeta Pasteur e um mínimo de solvente.
8. Dissolver o extrato bruto em solvente adequado (em geral diclorometano ou acetato de etila ou mistura de um destes com metanol).
9. Analisar o extrato bruto, assim diluído, por cromatografia de camada delgada (CCD, normalmente de sílica-gel) utilizando-se como eluente diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH) numa proporção de 1:1 (v/v), nesse caso específico. Para tanto, depositar algumas gotas (utilizar capilares de vidro) do extrato a ± 1 cm da base de uma placa de cromatografia. Proceder a eluição da placa, contendo diferentes frações, com a mistura de solvente mencionado, de maneira que haja a migração dos compostos ao longo da placa (Figura 1).
10. Após observação das frações sob luz ultravioleta, proceder cuidadosamente à remoção das diferentes manchas e colocar em Ependorf para subsequente dessorção das substâncias impregnadas no sílica-gel, com solvente apropriado.
11. As diferentes sub-frações serão testadas individualmente, embebidas em discos de papel de filtro com 5 mm de diâmetro ou colocando-as em um pequeno poço furado no meio de cultura, no centro de uma placa de Petri. Mergulha-se o disco de papel nos extratos e, antes de colocar na placa de Petri, evaporar o solvente utilizado para a dessorção das sub-frações. Para o método de difusão em ágar, coloca-se cerca de 40 μL /poço de extrato dissolvido em solvente e permite-se a evaporação do solvente antes da aplicação do organismo-teste. Para o ensaio, pulveriza-se, com um pulverizador De Vilbis esterilizado, uma suspensão de conídios do fungo-teste.

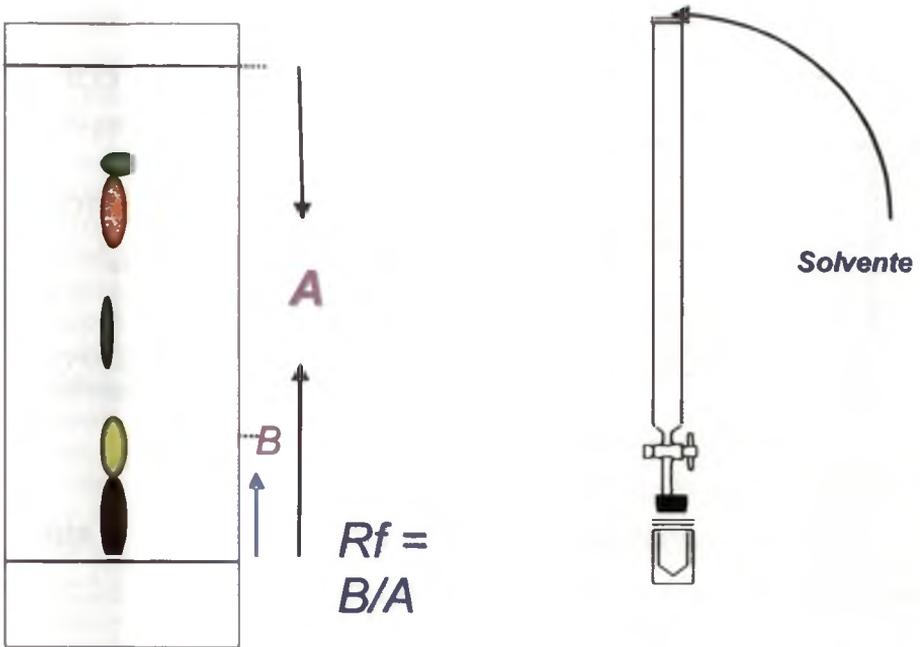
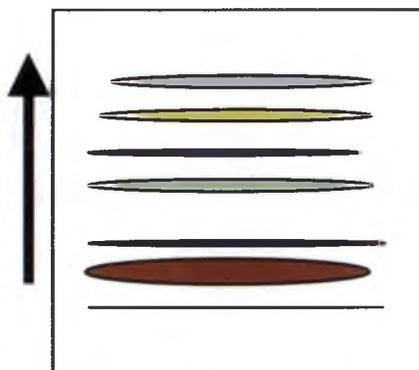


Fig. 1: Esquema de cromatografia em camada delgada (CCD), mostrando diferentes manchas e exemplo de cálculo de Rf de uma dada substância, e em coluna de sílica gel.

Fonte: Rosa T S. Frighetto.

12. Incubar as culturas até que se possa evidenciar o halo de inibição do crescimento miceliano do organismo-teste, mensurar o tamanho do halo de inibição.
13. Para ensaio de bioautografia, após identificação dos Rfs, será vertido sobre a placa comatográfica eluída, uma camada homogênea de meio de cultivo. Após soldificação do mesmo, pulveriza-se, com um pulverizador De Vilbis esterilizado, uma suspensão de conídios do organismo-teste, e a cultura ficará incubada dentro de uma caixa hermeticamente fechada, a 37°C (Figura 2). No experimento para TLC-MALDI, após identificação dos Rfs dos compostos ativos, será adicionado sobre os mesmos uma matriz líquida, no caso um líquido iônico, para auxiliar na ionização dos compostos para subsequente experimento de MALDI $[M^+H^+]^+$.



Reagentes específicos para visualização da atividade em CCD

Aplicar, em forma de *spray*, cerca de 5 ml de solução aquosa de:

Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC)
- Solução 20mg/ml ou
p-IodoNitroTetrazólio Violeta (INT)

- Solução 5mg/ml

- Incubar por mais 3 a 4 horas a 37°C.
- Pulverizar com etanol 70% antes da avaliação final.

Comparação de R_f 's



Isolamento do(s) composto(s) ativo

Fig. 2: Aplicação da CCD no bioensaio (bioautografia) contra microrganismos para a determinação de compostos ativos e visualização das zonas de crescimento (ou não) dos microrganismos teste.

Fonte: Rosa T. S. Frighetto.

14. As frações que apresentaram atividade antibiótica, assim determinadas pelos testes *in vitro* e identificadas pelos R_f s nas placas de cromatografia, serão submetidas à purificação e identificação química (Parte III).

Nota: No caso de fungos e actinomicetos a extração do filtrado pode não ser eficiente, em alguns casos, pois grande parte do metabólito liberado pela célula pode se depositar na parede celular. Aconselha-se, neste caso, proceder à extração do micélio. Também, aconselha-se adicionar à cultura, antes de efetuar o processo de extração, acetona numa concentração de 1,5:1 (caldo:acetona) (v/v) e agitar em uma mesa agitadora, por 30 minutos. Após a filtração, remover a acetona sob pressão reduzida em evaporador rotativo e, então, prosseguir a extração com solvente adequado.

Parte III – Purificação e identificação

Após a extração do filtrado da cultura com acetato de etila e subsequente evaporação do solvente, o resíduo do extrato pode ser fracionado e purificado através dos seguintes métodos:

1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Sem dúvida, podemos afirmar que a cromatografia em camada delgada é uma técnica rápida, barata, simples e das mais utilizadas rotineiramente. Sua desvantagem é a baixa precisão na quantificação (relativamente a HPLC e CG) e a falta de automação. Ela pode ser empregada em associação com a quantificação por densitômetro acoplado a um PC com software apropriado, onde a leitura de um composto padrão de concentração conhecida pode ser utilizada como referencial. As placas de CCD – de sílica gel com indicador de fluorescência 254 nm, na espessura de 0,2 mm sobre cartelas de alumínio ou de vidro de 20 x 20 cm – podem ser adquiridas comercialmente. Alternativamente, elas podem ser preparadas (por exemplo: para cinco placas de 20 x 20 cm): preparar as placas de vidro sobre uma superfície plana, limpá-las com hexano embebido em chumaço de algodão. Pesar 25 g de sílica gel para cromatografia em camada delgada, em um frasco Erlenmeyer com tampa, e acrescentar cerca de 50 mL de água destilada. Agitar bem até que a mistura fique homogênea e a consistência adequada para um espalhamento homogêneo. Para CCD, utiliza-se espessura de 0,25 mm de sílica gel sobre placas de vidro, e para cromatografia preparativa utiliza-se espessura de até 2 mm, sendo neste caso a quantidade de sílica e o volume de água duplicados. Uma revisão dessa técnica aplicada nas análises de alimentos e de outros interesses da agricultura pode ser encontrada em Sharma (2000).

2. Coluna cromatográfica de adsorção

A coluna de vidro é facilmente empacotada adicionando-se sílica gel, baseando-se na proporção de 1:30 (extrato/sílica gel) ou dependendo do caso até 1:100. Para tanto, a sílica é suspensa em solvente anteriormente selecionado através de análise por CCD, e passando várias vezes o solvente para melhor empacotamento da sílica. O extrato é adicionado na parte superior da coluna, dissolvido em solvente adequado ou adsorvido em pequena quantidade de sílica gel, e sobre essa camada adiciona-se pequena porção de lã de vidro para evitar o seu revolvimento no momento de proceder a eluição com diferentes solventes. A separação por coluna cromatográfica de sílica gel é facilmente utilizada tanto para pequenas como para grandes quantidades de amostra. Entretanto, muitas vezes é um processo lento e laborioso.

3. Cromatografia por exclusão molecular

Também conhecida como cromatografia de filtração em gel ou de permeação em gel, ela separa materiais com base em seus pesos moleculares. As moléculas maiores do que o tamanho dos poros do material de empacotamento (limite de exclusão) são eluídas primeiro, seguidas pelo restante em ordem decrescente de peso molecular.

4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC)

É particularmente utilizada para constituintes de altos pesos moleculares e pouco voláteis, bem como materiais termicamente instáveis. A análise por HPLC é uma técnica rápida, comparada aos métodos clássicos de cromatografia em camada, menos eficientes, e possibilita análises quantitativas além de permitir a automação da análise e aumentar a produtividade. A maior desvantagem desta técnica é o alto custo do equipamento.

Os materiais purificados podem ser identificados baseados em: i) valor de Rf em cromatografia em camada delgada (CCD); ii) coloração em CCD quando pulverizados com reagentes específicos; iii) através de espectros como o de infravermelho, ultravioleta, ressonância magnética nuclear de próton e carbono-13, e massa; e iv) dependendo da classe química, esses compostos são também caracterizados por eletroforese.

Parte IV – Exemplo de aplicação (FRIGHETTO; MELO, 1996)

Material e Métodos

Amostras de solo foram obtidas de três fazendas situadas ao norte do Estado de São Paulo, cultivadas com soja e tomate apresentando sintomas de doença causada por *S. sclerotiorum*. Foi isolado o fungo *T. koningii* pela técnica descrita em Melo et al. (1996). O método de microextração de metabólitos extracelulares foi descrito por Graeme-Cook e Faull (1991). Os metabólitos foram extraídos do meio líquido (2.500 mL), cultivado com *T. koningii* (linhagem TSS-3) após sete dias de incubação, livres de micélios através de filtração, com acetato de etila (3 x 700 mL). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido a vácuo em evaporador rotativo, resultando num resíduo oleoso de cor amarelada (1,0 g). O extrato bruto foi analisado por CCD e os componentes foram separados por técnicas cromatográficas, de coluna e em placa preparativa. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em equipamento Bruker AC 300, a 300 Mhz, em soluções a concentração de $\sim 10^{-3}M$ em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) e referência interna de Me_4Si . Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em Perkin Elmer FT-IR e ultravioleta (UV) em espectrofotômetro Perkin Elmer em etanol 95%. O ponto de fusão (não corrigido) foi obtido em bloco de Kofler.

Resultados e Discussão

O filtrado esterilizado em membrana de filtração inibiu o crescimento de *S. sclerotiorum* em cultura pura (Tabela 1). A extração do filtrado com acetato de etila resultou num óleo amarelado que, em análise por CCD, apresentou um componente principal e vários componentes minoritários. Por cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia em placa preparativa permitiu o isolamento do composto principal 1 (Rf 0.13, Sílica gel 60 F₂₅₄, hexano/EtOAc 1:3). O ponto de fusão do composto isolado foi de 99,1-102,3°C (não corrigido). O espectro de ¹³C-RMN do 1 apresentou 16 sinais de carbonos, sendo três de carbonos sp², assinalados como de um grupo carbonila (198.3 s) e dois carbonos olefínicos (δ 173.5 s, 112.6 s); indicando portanto que se trata de um composto bicíclico. Evidência da presença de uma ciclohexanona α,β-insaturada foi obtida do IV (ν max (KBr) 1650, 1620 cm⁻¹) e do espectro UV (λ max (EtOH) 260 nm).

Tabela 1: Percentagem de inibição de crescimento de *S. sclerotiorum* em ensaios de extratos brutos de três culturas de *T. koningii* (TSS-3, TSS-5 e TSS-12). Filtrados obtidos das culturas em meio líquido após 7 dias de incubação e extraídos com acetato de etila.

Linhagens	Inibição de Crescimento (%)	
	2 d após inoculação	3 d após inoculação
TSS-3	81.7	83.3
TSS-5	71.4	82.3
TSS-12	81.7	83.8

Dados são médias de seis repetições.

Fonte: FRIGHETTO; MELO (1996).

O espectro de massa de baixa resolução indicou um íon molecular (M^+) para o composto 1 de m/z 298, o mesmo de um composto previamente isolado e identificado como sendo koninginin D, com a fórmula molecular $C_{16}H_{26}O_5$ (DUNLOP et al., 1989). Uma comparação dos deslocamentos químicos em RMN dos 16 átomos de carbono do composto 1 e koninginin D apresentou certo grau de semelhança entre as estruturas desses dois compostos (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação dos sinais de ^{13}C -NMR obtidos para o Composto 1 e dos compostos estruturalmente relacionados como koninginin B, E and D.

Carbono	Composto 1	Koninginin D	Koninginin B	Koninginin E
C-1	198.3	195.8	198.1	197.6
C-2	27.1	33.3	27.1	33.3
C-3	28.6	28.8	29.0	29.0
C-4	71.0	65.7	71.0	65.9
C-5	173.5	171.5	171.3	169.3
C-6	112.6	113.9	109.1	111.4
C-7	57.2	57.1	17.6	17.6
C-8	31.7	31.7	22.7	22.8
C-9	76.8	77.7	80.8	81.3
C-10	72.8	73.2	73.2	73.4
C-11	33.1	32.4	32.8	32.7
C-12	25.4	25.1	25.4	25.1
C-13	29.2	29.2	29.2	29.3
C-14	31.1	32.2	31.7	31.8
C-15	22.6	22.6	22.6	22.6
C-16	14.1	14.0	14.1	14.1

Fonte: FRIGHETTO; MELO (1996).

Os deslocamentos químicos referentes aos carbonos da porção acíclica das moléculas são praticamente idênticos. As diferenças mais significativas entre os deslocamentos químicos dos carbonos foram registradas para C-1, C-2, C-4, C-5, C-6 e C-9 da porção benzopyran-5-ona das moléculas. O esclarecimento sobre a origem dessa diferença foi obtido pelos dados de ^{13}C -RMN de outros metabólitos de *T. koningii*, os compostos *koninginin B* e *koninginin E* (ALMASSI et al., 1991; PARKER et al., 1995), onde o padrão do deslocamento químico para os átomos de C-1 a C-4 do composto 1 é exatamente o de *koninginin B*. O carbono da porção éter em C-9 no composto 1 está protegido de 4.0 ppm comparado ao mesmo carbono em *koninginin B*, como é esperado pela presença de um grupo β -hidroxila em C-7 e o carbono vinílico em C-6 no composto 1 está desprotegido em comparação ao mesmo carbono em *koninginin B*, dando evidência da presença de uma substituição oxigenada em C-7 no 1, de forma similar ao *koninginin D*. Portanto, essas evidências permitem sugerir que o composto 1 e *koninginin D* são diastereoisômeros, sendo epímeros no C-4 (Figura 3), estando desprotegido de 5.3 ppm no composto 1 comparado ao mesmo carbono no *koninginin D*.

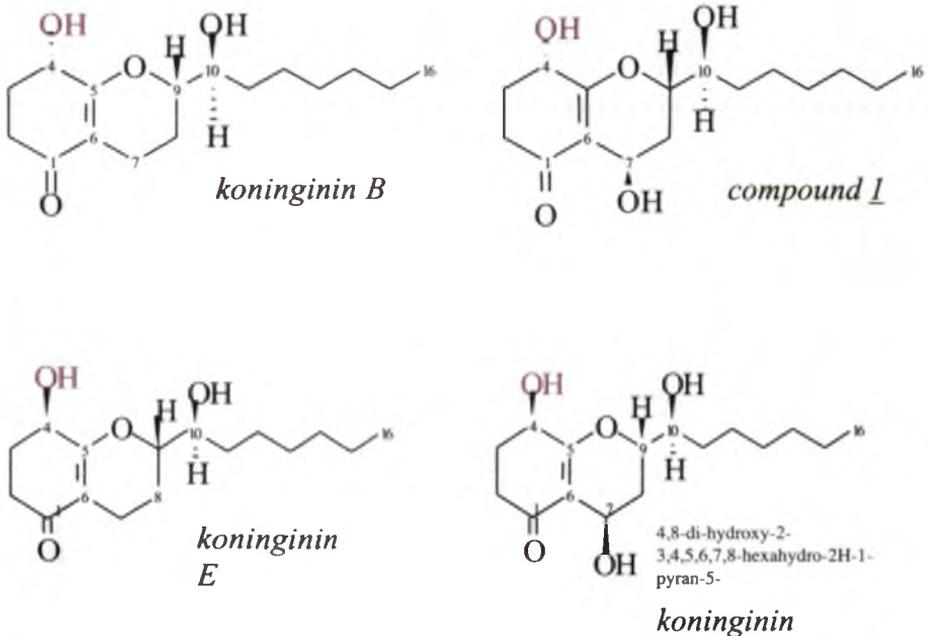


Fig. 3: Estrutura proposta para o composto 1 isolado de *T. koningii* (TSS-3). As estruturas dos compostos *koninginin B*, *E* e *D* são apresentadas para comparação (DUNLOP et al., 1989; ALMASSI et al., 1991; PARKER et al., 1995).

O composto 1 foi ativo contra *S. sclerotiorum* no ensaio por difusão em agar utilizando discos de papel de filtro contendo 10 e 20 μL por disco de uma solução 2.000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ do composto teste. O método de bioautografia foi usado em CCD vertendo, sobre a superfície de CCD, o meio de cultivo em ágar líquido inoculado com o microrganismo teste e visualizado com solução aquosa de p-iodonitrotetrazolium violeta e incubação por 3 horas.

Referências Bibliográficas

ALMASSI, F.; GHISALBERTI, E.; NARBAY, M. J.; SIVASITHAMPARAM, K. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 396-402, 1991.

DUNLOP, R. W.; SIMON, A.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 1, p. 67-74, 1989.

FRIGHETTO, R. T. S.; MELO, I. Isolation of a new biologically active compound from *Trichoderma koningii*. In: ISCE ANNUAL MEETING, 13., 1996, Prague, Czech Republic. **Books of Abstracts**. Praha: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, [1996]. p. 188

GHISALBERTI, E. L.; NARBAY, M. J.; DEW AN, M. M.; SIVASITHAMPARAM, K. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. **Plant and Soil**, v. 121, n. 2, p. 287-291, 1990.

GRAEME-COOK, K. A.; FAULL, J. L. Effects of ultraviolet-induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered antibiotic production on selected pathogens in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 659-664, 1991.

HEISEY, R. M.; MISHRA, S. K.; PUTNAM, A. R.; MILLER, J. R.; WHITENACK, C. J.; KELLER, J. E.; HUANG, J. Production of herbicidal and insecticidal metabolites by soil microorganisms. In: SYMPOSIUM ON BIOLOGICALLY ACTIVE NATURAL PRODUCTS, 194., 1987, New Orleans, LA. **Potential use in agriculture**. Washington, DC: American Chemical Society, 1988. p. 65-78. (ACS Symposium Series, 380).

HO, W. C.; KO, W. H. Alkalized water agar as a selective medium for enumerating soil actinomycetes. **Phytopathology**, v. 69, n. 9, p. 1031, 1979.

HOMMA, Y.; SUZUI, T. Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas capacia*. **Annals of the Phytopathological Society Japan**, v. 55, p. 643-652, 1989.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of four isolations of streptomycetes. **Nature**, v. 202, n. 493, p. 928-929, 1964.

LIEVENS, K. H.; VAN RIJSBERGEN, R.; LEYNS, F. R.; LAMBERT, B. J.; TENNING, P.; SWINGS, J.; JOOS, H. J.-P. Dominant rhizosphere bacteria as a source for antifungal agents. **Pesticide Science**, v. 27, n. 2, p. 141-154, 1989.

MELO, I. S.; FAULL, J. L.; GRAEME-COOK, K. A. *Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum* as destructive mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BACTERIOLOGY AND APPLIED MICROBIOLOGY DIVISION, 8., INTERNATIONAL CONGRESS OF MYCOLOGY DIVISION, 8., 1996, Jerusalem, Israel. [S.l.: s.n.], 1996. p. 183.

MIZUNO, K.; YAGI, A.; TAKADA, M.; MATSUURA, K.; YAMAGUCHI, K.; ASANO, K. A New antibiotic, talaron. **Journal of Antibiotics**, v. 27, n. 7, p. 561-563, 1974.

PARKER, S. R.; CUTLER, H. G.; SCHREINER, P. R. Koninginin E: Isolation of a biologically active natural product from *Trichoderma koningii*. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 59, n. 9, p. 1747-1749, 1995.

SHARMA, J. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 129-147, 2000.

STESSEL, G. L.; LEBEN, C.; KEIT, G. M. Screening tests designed to discover antibiotics suitable for plant disease control. **Mycologia**, v. 45, n. 3, p. 325-334, 1953.