

ISOLAMENTO DE *TRICHODERMA* DA AMAZÔNIA ORIENTAL UTILIZANDO MEIO SELETIVO E TÉCNICA INSECTBAITING

Marcos Paulo Meireles Filho¹, André da Luz de Freitas², Karina Azevedo dos Passos¹, John Jairo Saldarriaga Ausique³, Fábio Gomes Moura⁴, Hervé Louis Ghislain Rogez⁵

¹ Faculdade de Biotecnologia. Universidade Federal do Pará – UFPA, e-mail marcos.filho@icb.ufpa.br karinanazevedopassos5@gmail.com

² PPGBIOTEC-UFPA, e-mail andre.freitas@icb.ufpa.br

³ Universidade Estadual do Maranhão– UEMA, e-mail johnagro22@gmail.com

⁴ Faculdade de Biotecnologia-UFPA. PPGBIOTEC-UFPA. BIONORTE-UFPA, e-mail famoura@ufpa.br

⁵ Faculdade de Biotecnologia-UFPA. PPGBIOTEC-UFPA. PPGNBC-UFPA, e-mail herverogez@gmail.com

Palavras-chave

bioprospecção, metabarcoding, *Trichoderma* sp.

Introdução

O Brasil se destaca na produção mundial de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) alcançando 115 mil toneladas em 2020. O estado do Pará contribuiu com 31,5% da produção nacional ocupando o 2º lugar [1]. Na pipericultura doenças fúngicas como a Podridão-das-raízes e Murcha-amarela são um problema recorrente [2]. Uma das alternativas para o controle de doenças na pipericultura é a utilização de fungos antagonistas como os do gênero *Trichoderma*, que desempenham um papel importante na supressão de fitopatogênicos[3]. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é a bioprospecção de fungos do gênero *Trichoderma* em solos da Amazônia Oriental Paraense por técnica de meio seletivo e *Insectbaiting*.

Material e Métodos

10 amostras de solo (1kg) de áreas de florestas plantadas (3), agrícolas (4) e de vegetação nativa (3) do Estado do Pará foram coletadas e o isolamento por meio seletivo ocorreu da seguinte maneira: 10g de solo foi incubado em 100mL de solução de Tween 80 (0,075%) por 18h a 200rpm. Posteriormente, uma alíquota foi inoculada em meio Batata Dextrose Agar (BDA) suplementado com pentabiótico® (0,05%) a 27°C, umidade relativa (UR) de 70% por 7 dias. O isolamento por *Insectbaiting* ocorreu segundo ALVES^[4]. Brevemente, 100g de cada solo foi homogeneizado, peneirado (0,5mm) e adicionado 10 larvas de *Tenébrio molitor*. As larvas foram mantidas a 27°C em escotofase de 24h e após sua morte as mesmas foram desinfetadas superficialmente com solução de NaClO (3%) por 1min., depois lavadas com água estéril (3X). Cada inseto foi mantido individualmente a 27°C a 100% de UR até esporulação superficial (5-7 dias). O isolamento final do fungo ocorreu do mesmo modo realizado para o meio seletivo.

A identificação dos fungos foi realizada segundo TOJU *et al.* [5]. O DNA total foi extraído por Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,6µM de oligonucleotídeo *forward* e 0,6µM de oligonucleotídeo *reverse*, 40ng de DNA genômico. Para a amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS4 e ITS5 em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos das PCR foram avaliados em gel de agarose (2%) corados com UniSafe Dye e purificadas com Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). A reação de sequenciamento ocorreu por BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e a reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de sódio. O sequenciamento foi automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

O alinhamento múltiplo das sequências obtidas com o banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram realizadas com a ferramenta Clustal Omega [6]. A inferência filogenética foi customizada no site Phylogeny.fr [7]. No “*pipeline*” foi realizada a edição automática do alinhamento múltiplo pela ferramenta Gblocks com a Máxima Verossimilhança na ferramenta PhymL e o desenho do filograma por TreeDyn. A identificação dos isolados foi baseado numa abordagem de *metabarcoding* usando as sequências de DNAr como “etiquetas” de identificação [8].

Resultados e Discussão

A bioprospecção proposta neste trabalho foi capaz de obter 14 fungos do gênero *Trichoderma*, sendo 12 através da técnica de meio seletivo e 2 por *Insectbaiting* (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação molecular dos isolados fúngicos para o gênero *Trichoderma* de amostras de solo amazônico

Isolado	Espécie	Matriz de nucleotídeos Acesso/Similaridade	Blast NCBI Acesso/Similaridade	Complexo
UFPA01	<i>T. asperellum</i>	KY412854.1(99,41%)	MK791647.1(100%)	Viride
UFPA02	<i>T. asperellum</i>	KY412854.1(99,41%)	MK791647.1(100%)	Viride
UFPA03	<i>T. asperellum</i>	KR868273(98,63%)	KF815050.1(99,84%)	Viride
UFPA04	<i>T. asperellum</i>	KY412854.1(99,41%)	MK791647.1(100%)	Viride
UFPA05	<i>T. asperellum</i>	KY412854.1(99,41%)	MK791647.1(100%)	Viride
UFPA06	<i>T. koningiopsis</i>	KY412855(99,61%)	MH624143.1(99,34%)	Viride
UFPA07	<i>T. longibrachiatum</i>	KR868251(99,51%)	MK910052.1(100%)	Longibrachiatum
UFPA08	<i>T. asperellum</i>	KY412854.1(99,41%)	MK791647.1(100%)	Viride
UFPA09	<i>T. brevicompactum</i>	EU330942(100%)	MH624142.1(100%)	Brevicompectum

UFPA10	<i>T. asperellum</i>	KY412854.1(99,61%)	KR856215.1(100%)	Viride
UFPA11	<i>T. asperellum</i>	KT314308(98,74%)	JN108917.1(99,84%)	Viride
UFPA12	<i>T. asperellum</i>	KY412854.1(99,41%)	MK791647.1(100%)	Viride
UFPA13	<i>T. asperellum</i>	KR8682767(98,63%)	MK791647.1(100%)	Viride
UFPA14	<i>T. asperellum</i>	KR868308(99,29%)	MH752042.1(100%)	Viride

11 isolados foram classificados como *Trichoderma asperellum* (UFPA01, UFPA02, UFPA03, UFPA04, UFPA05, UFPA08, UFPA10, UFPA11, UFPA12, UFPA13, UFPA14) com valores acima de 98,63% na matriz nucleotídica e >99,84% de similaridade pelo NCBI; 01 isolado foi classificado como *T. koningiopsis* (UFPA06) com 99,61% de similaridade na matriz e >99,34% no NCBI; 01 como *T. longibrachiatum* (UFPA07) com identidade de 99,51% na matriz nucleotídica e 100% no NCBI e, por fim, 01 como *T. brevicompactum* (UFPA09) com 100% de similaridade tanto na matriz nucleotídica quanto no NCBI.

Na análise da árvore filogenética de 05 isolados de *Trichoderma* (UFPA03, UFPA05, UFPA10, UFPA13 e UFPA14) foi observado que as sequências não se alinharam com as sequências obtidas da literatura científica. Nesse caso foi necessário gerar uma sequência consenso “reversa”, porém, mesmo assim não houve uma clareza na sua distribuição. A árvore de *Trichoderma* catalogadas como “UFPA” se alinharam no mesmo clado (sem separação de clados por espécie); além disso, os isolados ficaram organizados próximos as sequências de espécies diferentes, por exemplo, o isolado UFPA13 alinhou-se entre *T. asperellum* e *T. koningiopsis*. Para compreender esta situação, foi realizada uma comparação com resultados de publicações que sequenciaram múltiplos genes e que conseguiram organizar as espécies muito próximas em “complexos” [9,10]. Por essa abordagem foi observado que o isolado UFPA13 apresentou 10 sequências mais próximas na árvore e com os índices elevados na matriz nucleotídica para o complexo *Viride*.

Utilizando a mesma técnica, HERMOSA *et al.* [11] sequenciaram as regiões ITS e identificaram 17 isolados de *Trichoderma* spp., com representantes das espécies *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, os quais são usados como biocontrole de vários fungos fitopatogênicos. Da mesma forma, LEYLAIE e ZAFARI [12] identificaram 07 isolados do gênero *Trichoderma* de 4 espécies, sendo elas *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. brevicompactum* e *T. asperellum*.

Conclusões

A bioprospecção de fungos do gênero *Trichoderma* em amostras de solos amazônicos obteve 14 isolados, sendo 12 através de meio seletivo (86%) e 02 por *Insectbaiting* (14%).

Avaliando a eficácia das metodologias utilizadas para o isolamento, a técnica de meio seletivo é a mais indicada para a obtenção de fungos com potencial antagonista de fitopatógenos, os quais, podem ser testados no controle de doenças da pipericultura.

Referências Bibliográficas

- [1] IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**, Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2020>, Acesso em 30/05/2022.
- [2] SARMA, Y.R. *et al.* **Diseases and insect pest of black pepper (*Piper nigrum*, L.)**. International Pepper Community (IPC). Jakarta, Indonesia, 2013.
- [3] HUMBER, R.A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 3, p. 262-266, 2008
- [4] ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. p. 1163.
- [5] TOJU, H. *et al.* **High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples**. Plos One, v. 7, n. 7, p.40863, 2012.
- [6] SIEVERS F.; HIGGINS D.G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**. v. 27, n. 1, p.135-145, 2018.
- [7] DEREPPER, A. *et al.* Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W465-W469, 2008.
- [8] RAJA, H.A. *et al.* Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.
- [9] JIANG, Y. *et al.* **Trichoderma biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species**. PloS one, v. 11, n. 8, p. e0160613, 2016.
- [10] SARAVANAKUMAR, K. *et al.* **Biodiversity of Trichoderma community in the tidal flats and wetland of southeastern China**. PloS One, v. 11, n. 12, p. e0168020, 2016.
- [11] HERMOSA M. R. *et al.* Genetic diversity shown in Trichoderma biocontrol isolates. **Mycological Research**. v. 108, n. 8, p. 897–906, 2013.
- [12] LEYLAIE, S.; ZAFARI, D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1484, 2018.