

FILIFE CONSTANTINO BOREL

**METABÓLITOS DE *Clonostachys rosea* INIBIDORES A *Botrytis cinerea*,
SOBREVIVÊNCIA DO ANTAGONISTA E EFEITO SOBRE O MICROBIOMA
FOLIAR DE TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B731m
2018 Borel, Filipe Constantino, 1986-
Metabólitos de *Clonostachys rosea* inibidores a *Botrytis cinerea*, sobrevivência do antagonista e efeito sobre o microbioma foliar de tomateiro / Filipe Constantino Borel. – Viçosa, MG, 2018.

viii, 58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mofo-cinzeno - Controle biológico. 2. Tomate - Doenças e pragas - Controle biológico. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

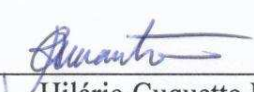
CDD 22. ed. 632.46

FILIPE CONSTANTINO BOREL

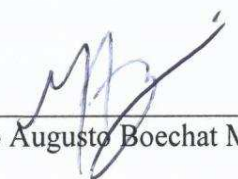
**METABÓLITOS DE *Clonostachys rosea* INIBIDORES A *Botrytis cinerea*,
SOBREVIVÊNCIA DO ANTAGONISTA E EFEITO SOBRE O MICROBIOMA
FOLIAR DE TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

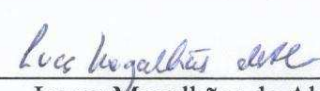
APROVADA: 23 de março de 2018.



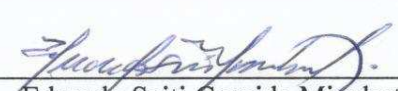
Hilário Cuquetto Mantovani




Marcelo Augusto Boechat Morandi



Lucas Magalhães de Abreu
(Coorientador)



Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Coorientador)



Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, conforto nas horas difíceis, por essa e tantas outras vitórias que tenho alcançado.

À minha família, meus pais Júlio e Maria, exemplos de trabalho e dedicação, por todo incentivo e torcida, mesmo distantes sonharam junto comigo esta conquista.

Aos meus irmãos Jerônimo e Bruna, pelo apoio e torcida. Aos meus cunhados Anderson e Francine pelo carinho e incentivos e aos meus sobrinhos Lavínia, Elisa e Anderson Filho

À Jaqueline, minha companheira, por toda paciência, amor e carinho.

À UFV, minha segunda casa, por toda a estrutura e formação. Ao Departamento de Fitopatologia, pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Maffia, meu orientador, pela amizade, ensinamentos e conselhos. A ele devo minha carreira científica e sem ele não poderia ter feito tanto.

Ao Prof. Eduardo, pelo suporte, ensinamentos e apoio durante toda a pós graduação e por ter possibilitado grande parte da tese.

Ao Prof. Hilário, pelos ensinamentos, conselhos e por ter gentilmente me recebido em seu laboratório para realizar as análises e transmitir conhecimento.

Ao Prof. Lucas, pela colaboração e ensinamentos.

Ao Prof. Murilo Alves, pelo apoio ao qPCR, ensinamentos, conselhos e amizade.

Ao Prof. Tiago Mendes, pela ajuda nas análises de sequenciamento e bioinformática.

Ao IC Alexander Giovani, pela dedicação e paciência em executar os trabalhos.

À Deborah, pela amizade, conselhos e paciência em ajudar a traçar esse sonho. Não poderia ter concluído o doutorado sem sua ajuda.

Ao Tomás pela ajuda nas análises e paciência nos momentos de correria.

À toda equipe da Unidade de Controle Biológico, pela ajuda e descontração.

Às “amizades” do laboratório de Anaeróbios, Elsinha, Sofia e Juliana pelo apoio, acolhida e descontração. O doutorado não teria sido o mesmo sem a ajuda de vocês.

Ao Prof. Murilo Zerbini e equipe, pela disponibilidade no uso dos equipamentos.

Ao Sr. Mário e D. Neuza, por todo apoio, conforto e sabedoria de vida.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia- UFV.

Aos amigos que fiz em Viçosa e que levarei por toda a vida.

Obrigado!

Biografia

FILIPPE CONSTANTINO BOREL, filho de Júlio José Borel e Maria da Conceição Constantino Borel, nasceu em 06 de setembro de 1986, em Manhuaçu-Minas Gerais. Iniciou o curso de Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa, em março de 2007, graduando-se em janeiro de 2012. Em março de 2012 ingressou no curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa e obteve o título de mestre em fevereiro de 2014. No mês seguinte, ingressou no curso de doutorado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Capítulo 1. Metabólitos secundários de <i>Clonostachys rosea</i> com efeito supressivo a <i>Botrytis cinerea</i>	
Resumo.....	5
Introdução.....	5
Metodologia.....	7
Resultados.....	10
Discussão.....	17
Referências bibliográficas.....	19
Capítulo 2. Sobrevivência de <i>Clonostachys rosea</i> no filoplano, rizosfera e rizoplano de tomateiro	
Resumo.....	23
Introdução.....	23
Metodologia.....	24
Resultados.....	26
Discussão.....	30
Referências bibliográficas.....	32
Capítulo 3. Microbiota foliar de tomateiro versus aplicação de <i>Clonostachys rosea</i> NCR61/F	
Resumo.....	35
Introdução.....	35
Metodologia.....	37
Resultados.....	41
Discussão.....	50
Referências bibliográficas.....	53
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58

RESUMO

BOREL, Filipe Constantino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Metabólitos de *Clonostachys rosea* inibidores a *Botrytis cinerea*, sobrevivência do antagonista e efeito sobre o microbioma foliar de tomateiro.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Coorientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Lucas Magalhães Abreu.

Clonostachys rosea é eficaz no biocontrole de várias doenças fúngicas. Ao longo dos anos, constatou-se a eficiência de isolados obtidos no Brasil no biocontrole do mofo cinzento do tomateiro, causado por *Botrytis cinerea*. Há evidências de que o isolado NCR61/F produza compostos supressivos ao patógeno, mas desconhecia-se a bioatividade e a natureza desses compostos. Assim, estudou-se a bioatividade de compostos de filtrados e extratos do cultivo de *C. rosea* em meio líquido a *B. cinerea* e se caracterizaram os metabólitos secundários produzidos. Filtrados e extratos do crescimento do isolado inibiram o crescimento micelial e a germinação de conídios de *B. cinerea*. O antagonista produziu 51 metabólitos, como peptaibols, glisopreninas e bissorbicilinoídes e alguns indetermínados, principalmente após 10 dias de cultivo. *Clonostachys rosea* é adaptado a diferentes ecossistemas e pode colonizar tecidos de raízes e folhas, mas a dinâmica de sobrevivência nesses tecidos é pouco compreendida. Estudou-se a sobrevivência do isolado NCR61/F como epífita em folhas, na rizosfera e no rizoplano de tomateiros, até 48 dias após a aplicação. A sobrevivência do antagonista diminuiu ao longo do tempo nas superfícies foliares e radiculares, mas sua população permaneceu estável na rizosfera de tomateiros. Um aspecto fundamental e inédito quanto a aplicações de *C. rosea* é seu efeito na microbiota de folhas de tomateiro, o que foi, também, estudado. O efeito deletério de *C. rosea* no microbiota foi de curta duração e transiente. O efeito foi maior nas comunidades epifítica e endofítica de fungos, com maior redução em diversidade e riqueza de comunidades até 3 dias após a aplicação. A abundância de filos e alguns gêneros, como *Cladosporium* e *Alternaria*, e *Cercospora* foi menor nas plantas tratadas com o antagonista que nas não tratadas. Em bactérias epifíticas, houve maiores alterações na diversidade aos 3 e 12 dias, e gêneros como *Bacillus*, *Arthrobacter* and *Enterobacter* foram menos abundantes nos dias iniciais após a aplicação. Ao final das avaliações (24 dias), houve resiliência da microbiota foliar de plantas tratadas com o antagonista e aumento gradual das populações. Em conclusão, constatou-se que *C. rosea* produz compostos inibitórios a *B. cinerea*, pode sobreviver em folhas e raízes e rizosfera de tomateiro e altera de forma transitória as comunidades fúngicas e bacterianas da solanácea. As informações aqui geradas são relevantes para compreender os mecanismos de antagonismo de *C. rosea* NCR61/F, sua capacidade de

sobrevivência e o efeito perturbador da sua aplicação no microbiota do tomateiro. O conhecimento gerado é importante para traçar estratégias de uso do antagonista e, até mesmo, para validar o seu uso sustentável como agente de biocontrole.

ABSTRACT

BOREL, Filipe Constantino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Metabolites of *Clonostachys rosea* inhibitors to *Botrytis cinerea*, antagonist survival and effect on the tomato leaf microbiome.** Adviser: Luiz Antonio Maffia. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Lucas Magalhães Abreu.

Clonostachys rosea is effective in biocontrol of several fungal diseases. Over the years, we studied the efficiency of isolates obtained in Brazil in the biocontrol of gray mold of tomato, caused by *Botrytis cinerea*. There is evidence that the *C. rosea* isolate NCR61/F produces compounds suppressive to the pathogen, but the bioactivity and nature of these compounds was unknown. Thus, the bioactivity of filtrate compounds and extracts of *C. rosea* culture in liquid medium against *B. cinerea* was studied and the secondary metabolites produced were characterized. Filtrate and extracts from the growth of the isolate inhibited the mycelial growth and conidial germination of *B. cinerea*. The antagonist produced 51 metabolites, such as peptaibols, glisoprenins and bis-sorbicilinoids and some undetermined, mostly after 10 days of culture. *Clonostachys rosea* is adapted to different ecosystems and can colonize tissues of roots and leaves, but the dynamics of survival in these tissues is little understood. The survival of the isolate NCR61/F was studied as epiphyte in leaves, rhizosphere and rizoplane of tomato plants, up to 48 days after application. The survival of the antagonist decreased over time on leaf and root surfaces, but its population remained stable in the tomato rhizosphere. A fundamental and new aspect of the applications of *C. rosea* is its effect on the microbiota of tomato leaves, which was also studied. The deleterious effect of *C. rosea* on the microbiota was transient. The effect was higher in the epiphytic and endophytic communities of fungi, with greater reduction in diversity and richness of communities until 3 days after application. The abundance of phylum and some genera, such as *Cladosporium*, *Alternaria* and *Cercospora* was lower in plants treated with the antagonist than in plants not treated. Regarding epiphytic bacteria, there were major changes in diversity at 3 and 12 days, and genera such as *Bacillus*, *Arthrobacter* and *Enterobacter* were less abundant in the initial days after application. At the end of the evaluations (24 days), there was resilience of the foliar microbiota of plants treated with the antagonist and gradual increase of the populations. In conclusion, it was found that *C. rosea* produces inhibitory compounds to *B. cinerea*, can survive in leaves, roots and rhizosphere of tomato and transiently changes the fungal and bacterial communities of tomato plants. The information generated here is relevant to understand the mechanism of antagonism of *C. rosea* NCR61/F, its ability to survive and the disturbing effect of its application on the tomato microorganism. The

generated knowledge is important to draw strategies of antagonist use and even to validate its sustainable use as biocontrol agent.

INTRODUÇÃO GERAL

Clonostachys rosea é um fungo saprófita adaptado a diferentes ecossistemas, sendo encontrado desde solos cultiváveis em regiões tropicais a florestas temperadas (Sutton et al., 1997). O fungo é um antagonista agressivo de vários fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe grisea*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria* spp., *Gibberella zeae* (Saraiva et al., 2014; Thines et al., 1997, Sutton et al., 1997, Hue et al., 2009, Jensen et al., 2004, Rodriguez et al., 2011) e *Botrytis cinerea* (Borges et al., 2015). O controle das doenças causadas por *B. cinerea* é difícil. É crescente a ênfase de adoção do biocontrole com *C. rosea* no manejo do mofo cinzento, causado pelo patógeno em roseira, morangueiro, tomateiro entre outras (Sutton et al., 1997, Morandi et al., 2001, 2003, Saraiva et al., 2015).

O mofo cinzento do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) ocorre principalmente em condições de cultivo protegido. Nestas condições, as plantas estão menos sujeitas a variações ambientais, mas propícias ao mofo cinzento, que pode causar perdas severas na cultura (Dik & Wubben et al., 2004). O controle biológico de *B. cinerea* em tomateiro é uma boa alternativa ao químico, visto a eficiência de *C. rosea* no manejo da doença (Sutton et al., 2002, Kapongo et al., 2008, Mouekouba et al., 2014, Saraiva et al., 2015, Borges et al., 2015), mas há poucos estudos relacionados à ecologia do antagonista e de sua interação com a microbiota foliar, onde o antagonista é comumente aplicado em tomateiro.

A eficiência de agentes de controle biológico pode ser relacionada à produção de metabólitos tóxicos a patógenos (Degenkolb et al., 2015). Apesar do hiperparasitismo e da competição por espaços e nutrientes serem considerados os principais mecanismos de antagonismo de *C. rosea* (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2001), o antagonista também produz metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas deletérios a fitopatógenos (Rodriguez et al., 2011, Liu et al., 2006). Entretanto, a bioatividade e natureza de metabólitos de isolados brasileiros de *C. rosea* é pouco estudada, e dispersa na literatura.

Alguns requerimentos para um bom agente de controle biológico, como colonizar tecidos sem causar doença, ser antagonista eficiente e permanecer efetivamente nos campos de infecção, são comumente atendidos por isolados de *C. rosea* (Sutton et al., 1997; Fravel, 2005; Nobre et al., 2005). Como mencionado, o antagonista foi eficiente no biocontrole de *B. cinerea* em tomateiro, e tem grande potencial no manejo do mofo cinzento (Saraiva et al., 2015, Borges et al., 2015). *Clonostachys rosea* colonizou tecidos de tomateiro e neles permaneceu viável (Sutton et al., 2002, Karlsson et al., 2015).

Entretanto, as informações sobre a sobrevivência do fungo na rizosfera e rizoplano da solanácea são escassas. Pode ser que o fungo seja recuperado no filoplano, mas em baixa população, e assim não exerça o antagonismo eficientemente (Costa et al., 2013). Por outro lado, pode ser que, mesmo sob condições adversas e em população menor consiga suprimir o patógeno (Nobre et al., 2005; Morandi et al., 2008; Nechet et al., 2017). Assim, é importante conhecer a dinâmica da sobrevivência de antagonistas nos diferentes sítios de atuação, para auxiliar a definir intervalos e estratégias de aplicação.

Diante de todas as vantagens competitivas frente a patógenos, desconhece-se como *C. rosea* interage com comunidades microbianas não alvo. Historicamente, em estudos de controle biológico, a maioria das interações de antagonistas abordadas, *C. rosea* inclusive, focam na tríade hospedeiro-patógeno-agente de controle biológico, e as interações com comunidades microbianas são comumente ignoradas (Massart et al., 2015). Apesar de as comunidades microbianas se adaptarem aos nichos que ocupam, os mesmos mecanismos que antagonistas usam no controle biológico de patógenos podem atingir microrganismos não alvo, o que altera o equilíbrio microbiano e, em última análise, a sanidade vegetal. Conhecer a microbiota de plantas e como responde às aplicações de agentes de controle biológico poderia ajudar a melhorar a eficiência no controle de doenças (Berendsen et al., 2012).

Na Unidade de Controle Biológico da UFV, vem-se avaliando a eficiência de isolados brasileiros de *C. rosea* no biocontrole de *B. cinerea* desde 2003 (Nobre 2005). Apesar do conhecimento acumulado, ainda há lacunas, relacionadas aos parágrafos anteriores, a se preencher. Assim, este trabalho objetivou: i. avaliar a supressão de *B. cinerea* por metabólitos secundários produzidos pelo isolado NCR61 e caracterizar quimicamente esses metabólitos ii. estudar a dinâmica da sobrevivência de *C. rosea* no filoplano, rizoplano e rizosfera de tomateiros e iii. investigar se a aplicação de *C. rosea* na parte aérea afeta a microbiota foliar do tomateiro.

Referências bibliográficas

- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17:478-86.
- Borges ÁV, Saraiva RM, Maffia LA. 2015. Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 40:71-6.
- Costa LB, Rangel DEN, Morandi MAB, Bettiol W. 2013. Effects of UV-B radiation on the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* to *Botrytis cinerea* on strawberry leaves. *Biological Control* 65:95-100.

- Degenkolb T, Fog Nielsen K, Dieckmann R, Branco-Rocha F, Chaverri P, et al. 2015. Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* Complex. *Chemistry & Biodiversity* 12:662-84.
- Dik AJ, Wubben JP, 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht: Springer Netherlands, 319-33.
- Fravel DR, 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review Phytopathology* 43:337-59.
- Hue AG, Voldeng HD, Savard ME, Fedak G, Tian X, Hsiang T. 2009. Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Canadian Journal of Plant Pathology* 31:169-79.
- Jensen B, Knudsen IMB, Madsen M, Jensen DF. 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology* 94:551-60.
- Kapongo JP, Shipp L, Kevan P, Sutton JC, 2008. Co-vectoring of *Beauveria bassiana* and *Clonostachys rosea* by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and suppression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biological Control* 46: 508-14.
- Karlsson M, Durling MB, Choi J, Kosawang C, Lackner G, et al. 2015. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biology and Evolution* 7:465-80.
- Li J, Yang J, Huang X, Zhang K-Q. 2006. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry* 41:925-9.
- Massart S, Martinez-Medina M, Jijakli MH, 2015. Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biological Control* 89: 98-108.
- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG. 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26:311-7.
- Morandi MAB, Maffia LA, Sutton JC, 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29: 103-13.

- Morandi MAB, Mattos LPV, Santos ER, Bonugli RC, 2008. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* 27: 77-83.
- Mouekouba LDO, Zhang L, Guan X, Chen X, Chen H, Zhang J, Zhang J, Li J, Yang Y, Wang A, 2014. Analysis of *Clonostachys rosea* induced resistance to tomato gray mold disease in tomato leaves. *Plos One* 9, e102690.
- Nechet KL, Vilela ESD, Heck DW, Terao D, Halfeld-Vieira BA. 2017. Effect of increased UV-B radiation on biological control of the gray mold by *Clonostachys rosea* and on the expression of strawberry defense-related enzymes. *Australasian Plant Pathology* 46:107-13.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34:132-43.
- Rodriguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110:1177-86.
- Saraiva RM, Borges AV, Macedo PEF, Maffia LA. 2014. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole. *Revista de Ciencias Agrícolas* 31: 78 – 91.
- Saraiva RM, Czymmek KJ, Borges ÁV, Caires NP, Maffia LA. 2015. Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. *Biocontrol Science and Technology* 25:56-71.
- Sutton JC, Li D-W, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM. 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81:316-28.
- Sutton JC, Liu W, Huang R, Owen-Going N, 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12: 413-25.
- Thines E, Eilberta F, Sternerb O, Ankea H. 1997. Glisoprenin A, an inhibitor of the signal transduction pathway leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea* on hydrophobic surfaces. *FEMS Microbiology Letters* 151: 219-224.

Capítulo 1

Metabólitos secundários de *Clonostachys rosea* com efeito supressivo a *Botrytis cinerea*

Resumo

Clonostachys rosea NCR61/F é antagonista eficiente a *B. cinerea* por meio de vários mecanismos, como a produção de compostos tóxicos ao patógeno. Todavia, desconhece-se a bioatividade e a natureza dos metabólitos produzidos pelo antagonista. Portanto, objetivou-se avaliar a inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios de *B. cinerea* por metabólitos produzidos pelo isolado NCR61 de *C. rosea* e caracterizar quimicamente os metabólitos produzidos *in vitro*. Filtrados e extratos de *C. rosea* reduziram o crescimento de *Botrytis cinerea*, e obteve-se maior eficiência de redução com 10 dias que com 3 dias de cultivo do antagonista em meio líquido. Filtrados liofilizados reduziram a germinação de conídios do patógeno em lâminas. A redução do crescimento e da germinação aumentou com o aumento da concentração do extrato e do filtrado. Em meio líquido de cultivo, *C. rosea* produziu 51 metabólitos secundários, principalmente peptaibols, glisopreninas e bissorbicilinoídeos, além de moléculas ainda não descritas. Produziu-se maior número de metabólitos também no cultivo de 10 dias. Esses resultados demonstram o potencial de *C. rosea* em atuar pela produção de compostos inibitórios a *B. cinerea* e são importantes para entender o processo de antagonismo contra o patógeno.

Introdução

Clonostachys rosea é agente de controle biológico inespecífico, que pode colonizar fungos e nematoides vivos, matéria orgânica morta e ampla gama de espécies vegetais (Sutton et al., 1997; Nygren et al. 2018). Atualmente, *C. rosea* é usado no controle biológico de patógenos importantes, como *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe grisea*, *Verticillium dahliae* e *Fusarium culmorum* (Saraiva et al., 2014; Thines et al., 1997, Sutton et al., 1997, Rodriguez et al., 2011), por meio de vários mecanismos de antagonismo: indução de resistência a doenças, competição por espaços e nutrientes, hiperparasitismo e produção de compostos supressivos a patógenos (Nygren et al., 2018, Sutton et al., 1997, Rodriguez et al., 2011).

Entre os compostos supressivos, encontram-se os metabólitos secundários, que não estão diretamente envolvidos no crescimento, mas auxiliam na sobrevivência, principalmente em aspectos relacionados à competição, simbiose, auto-proteção etc.

(Zeilinger et al., 2016). Os fungos filamentosos produzem esses metabólitos, amplamente diversos química e biologicamente, os quais podem ter atividade fitotóxica, antimicrobiana, antitumoral etc. (Calvo et al., 2002; Fox & Howlett, 2008; Romero et al., 2011). Sabe-se que a ausência desses metabólitos não resulta em morte imediata mas, a longo prazo, pode resultar em perdas na adaptabilidade do organismo (Vipul et al, 2014).

A função dos metabólitos secundários é variável; em muitos casos, desconhece-se o benefício que conferem (Calvo et al., 2002). Provavelmente, a maior vantagem desses metabólitos seja favorecer a sobrevivência de um organismo no seu nicho ecológico (Fox, Howlett, 2008). Primariamente, *C. rosea* é fungo saprofítico, que precisa competir no ambiente hostil e complexo de microrganismos saprófitas. Estes interagem principalmente pela competição, e acredita-se que o principal mecanismo de ação seja a antibiose causada por metabólitos secundários, como forma de inibir o crescimento de predadores ou competidores ou de matá-los (Macheleidt et al, 2016). Comumente, os micoparasitas antagonizam e matam as presas pela ação combinada de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas (Zeilinger et al., 2016).

Clonostachys rosea é micoparasita destrutivo. Atribui-se o micoparasitismo à produção de enzimas (quitinase e glucanase) que degradam a parede celular fúngica, de toxinas ou compostos antifúngicos, antibacterianos ou antinematóides (Song et al., 2016, Rodriguez et al., 2011). O efeito antifúngico é o mais conhecido desses compostos. Por exemplo, já se associou *C. rosea* à produção de terpenóides (glisopreninas C, D e E) supressivos a *M. grisea* (Sterner et al., 1998), peptaibols supressivos a *S. sclerotiorum* (Rodriguez et al., 2011), trioxipiperazina (gliocadina C) e resorcinol alcalino, com efeito nematicida (Song et al., 2016).

O isolado NCR61 de *C. rosea*, obtido de condições brasileiras (Nobre et al., 2005), é eficiente no controle de *B. cinerea* em plantas de rosa (Nobre et al., 2005), morango (Cota et al., 2008) e tomate (Borges et al., 2015), principalmente por meio de competição e de hiperparasitismo. Em ensaios preliminares, o isolado produziu pigmentos amarelados em meio de cultura e inibiu o crescimento micelial de *B. cinerea*, quando se usou a técnica de papel celofane sobre meio de cultura (dados não publicados). Em vista desses indícios e dos relatos relacionados à produção de metabólitos secundários por *C. rosea*, levantou-se a hipótese de que o isolado NCR61 também produza metabólitos tóxicos a *B. cinerea*. Sabendo-se que a produção de compostos podem variar entre estirpes fúngicas da mesma espécie a hipótese é justificável (Zeilinger et al., 2016; Calvo et al., 2002). Assim, objetivou-se: i. avaliar a inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios de

B. cinerea por metabólitos secundários produzidos pelo isolado NCR61 e ii. caracterizar quimicamente esses metabólitos em micro-escala.

Metodologia

Os experimentos transcorreram na Unidade de Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Cultivou-se o isolado NCR61/F de *C. rosea* em meio de batata dextrose ágar (BDA), em placas de petri de 9 cm de diâmetro (usadas nos experimentos), a 25°C sob luz fluorescente, 12 h de fotoperíodo. Após 10 dias, transferiu-se um disco de micélio (0,6 cm de diâmetro) para 150 mL de meio de caldo-batata-dextrose (PDB) Himedia® em Erlenmeyers de 250 mL (seis Erlenmeyers por tratamento), os quais permaneceram a 25±2 °C, sob agitação contínua a 150 rpm. Para a testemunha, transferiu-se um disco de meio estéril para PDB.

Para obter compostos do metabolismo secundário, adotaram-se duas estratégias: filtragem e extração com solvente orgânico. Na filtragem, após 3 ou 10 dias de incubação, nos regimes de luz fluorescente contínua ou escuro contínuo (quatro condições), verteu-se o conteúdo de cada Erlenmeyer em camada dupla de gaze. O conteúdo foi homogeneizado, separaram-se 30 mL, os quais foram filtrados em membranas Acrodisc® Syringe filters, acopladas a seringas esterilizadas. O filtrado foi homogeneizado e usado em bioensaios em placas de Petri. Adicionalmente, mantiveram-se 14 Erlenmeyers sob luz fluorescente, fotoperíodo de 12 h, sob agitação contínua. Após 10 dias, como anteriormente, obteve-se o filtrado (2 L aproximadamente), que foi colocado em vasilhames de alumínio de 500 mL, congelado a -80°C e mantido em liofilizador Delta LSC224M24 por 12h. O conteúdo da liofilização foi raspado, pesado e mantido em frascos âmbar a -20°C até o uso nos experimentos.

Para extrair os compostos por meio de solvente orgânico, igualaram-se os volumes do restante do filtrado obtido nas quatro condições (800 mL por condição), e adicionou-se acetato de etila (para 10%), em frascos de borosilicato de 1 L. A mistura foi agitada vigorosamente (1 min) e sonicada (10 min); e separou-se a fase orgânica em balão volumétrico. Executou-se o procedimento por três vezes. A partir da fase orgânica, evaporou-se o solvente em rotoevaporador Eyela® modelo N-1200BV-W, transferiu-se o extrato concentrado para frascos âmbar, estimou-se a massa, e armazenou-se a -20 °C.

Supressão do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelo filtrado

Do filtrado obtido em cada uma das quatro condições, transferiram-se 30 mL para 270 mL de meio BDA semifundente ($47 \pm 2^\circ\text{C}$), agitou-se e distribuiu-se o conteúdo em dez placas de Petri. Após cultivar *B. cinerea* em BDA em placas de Petri durante 5 dias, sob luz fluorescente a 25°C , retiraram-se discos de micélio (0,6 cm de diâmetro), os quais foram semeados no centro das dez placas (um disco/placa), e incubou-se a 25°C , 12 h de fotoperíodo. Quando o crescimento fúngico da testemunha atingiu as bordas da placa, mediu-se o diâmetro das colônias. Transformou-se a medida do crescimento micelial, para eficiência na redução do crescimento em relação a testemunha. Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (dois tempos de cultivo x duas condições de incubação), com dez repetições (uma unidade experimental = uma placa de Petri).

Supressão da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelo liofilizado

Do filtrado liofilizado, prepararam-se quatro concentrações (1250, 2500, 5000 e $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em água ultrapura. Com auxílio de um hemacitômetro, preparou-se uma suspensão com 10^5 conídios de *B. cinerea.mL}^{-1}, obtidos de cultivo do fungo por 5 dias em BDA, a 22°C , 12 h de fotoperíodo. Depositaram-se 10 μl da suspensão de conídios e 10 μl de solução de cada concentração do liofilizado (a testemunha foi água ultrapura) em lâminas de vidro para microscopia, onde foram misturadas. As lâminas permaneceram dentro de caixas do tipo gerbox sob luz fluorescente e 12 h de fotoperíodo, a 22°C , sobre tela de metal e papel umedecido. Após 6 h, adicionou-se lactofenol para interromper a germinação dos conídios, que foi avaliada sob microscópio de luz. Considerou-se germinado o conídio cujo tubo germinativo era maior ou igual ao seu diâmetro. Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC, com cinco concentrações do liofilizado e cinco repetições (uma unidade experimental = uma lâmina).*

Avaliou-se, também, o crescimento micelial do patógeno na presença do liofilizado. De cada concentração, misturaram-se 5 mL a 45 mL de BDA semi-fundente em Erlenmeyers de 100 mL. Além da testemunha (água ultrapura), obtiveram-se quatro concentrações finais: 125, 250, 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Verteu-se a mistura em cinco placas de Petri de 9 cm de diâmetro (10 mL/placa). No centro de cada placa, depositou-se um disco de crescimento micelial de *B. cinerea*, incubou-se e avaliou-se como anteriormente. Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC com cinco concentrações do composto liofilizado de *C. rosea* e cinco repetições (uma unidade experimental = uma placa de Petri).

Supressão do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelo extrato orgânico

Diluiu-se o extrato em água ultrapura e DMSO 5% (v/v), e se obtiveram 2 mL das concentrações de 100, 500, 1000, 5000 e 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tubos de ensaio. Transferiu-se o conteúdo de cada tubo para 18 mL de meio BDA semi-fundente, homogeneizou-se e verteu-se a mistura em três placas de Petri (neste experimento de 6 cm de diâmetro). Além da testemunha (água ultrapura e DMSO 5%), obtiveram-se as concentrações finais de 10, 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Avaliou-se o crescimento micelial de *B. cinerea* como anteriormente. Executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em DIC, em esquema fatorial (dois tempos de cultivo x duas condições de incubação x seis concentrações do composto) e três repetições (uma unidade experimental = uma placa de Petri).

Caracterização dos metabólitos secundários de *Clonostachys rosea*

Do extrato orgânico obtido do crescimento nas quatro condições, transferiram-se 5 mg para tubos plásticos de 2 mL, contendo 300 μL de metanol (99,9% de pureza). Sonicou-se por 10 min, centrifugou-se a 14000 rpm por 5 min, transferiu-se o sobrenadante para novos tubos e evaporou-se o solvente em um concentrador Speed Vac[®] Thermo Fisher.

As amostras foram preservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e remetidas ao Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas e Cianobactérias, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Analisou-se por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS/MS). Para as separações, usou-se um cromatógrafo Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com um detector por arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e uma coluna analítica Luna C18 de 100 x 2,1mm (Phenomenex, Torrance, CA), mantida a 40°C . Usou-se o Espectrômetro de massa Micro TOF-QII (Bruker Daltonics, MA). Diluíram-se as amostras em 150 μL de acetonitrila, e o volume injetado foi de 0,5 μL . A fase móvel para injeção foi água ultrapura, mais 20 μmol de ácido fórmico e acetonitrila e mais 20 μmol de ácido fórmico. O fluxo usado foi de 0,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; o gradiente de eluição foi: 15% de acetonitrila por 2 min, 15 a 100% de acetonitrila durante 12 min; 100% de acetonitrila por 2 min e retorno a 15% de acetonitrila em 30 seg. Obtiveram-se os espectros de massa no modo positivo, no intervalo de 100 a 1000 m/z. Usou-se a fragmentação automatizada de íons de alta intensidade para gerar os espectros de fragmentação (MS/MS). Os cromatogramas gerados foram processados no software Data Analysis 4.1 (Bruker

Daltonics) e as moléculas automaticamente detectadas com base nos padrões de coocorrência e de fragmentação pelo algoritmo AutoMS(n). Os dados de alta resolução do íon pseudomolecular ($M+H^+$) e dos adultos comumente produzidos ($M + Na^+$; $M+NH_4^+$ e $2M+Na^+$) foram usados para estimar a fórmula molecular das substâncias identificadas. As fórmulas foram comparadas àquelas de metabólitos produzidos por espécies de *Clonostachys*, obtidos do banco de dados Antibase 2013 (Laatsch, 2013). Os resultados positivos foram validados, quando possível, por meio do padrão de quebra das moléculas no modo MS/MS. Para selecionar os metabólitos que ocorreram mais abundantemente nos extratos, consideraram-se apenas as moléculas com mais que 1000 unidades de íons produzidos.

Resultados

Pelo teste de Bartlett, obteve-se homogeneidade de variâncias entre as execuções para os experimentos: com o uso do filtrado ($P=0,46$); com o filtrado-liofilizado em lâmina ($P=0,41$) e placa de Petri ($P=0,09$) e com extrato orgânico ($P=0,1$). Então, analisaram-se as execuções experimentais conjuntamente.

Supressão do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelo filtrado

O filtrado reduziu o crescimento micelial de *B. cinerea* em meio de cultura. Os efeitos individuais do tempo de incubação e do regime de luminosidade foram significativos ($P<0,001$), mas não houve interação significativa de ambos ($P=0,59$). A maior eficiência foi com 10 que com 3 dias de incubação, bem como quando *C. rosea* cresceu sob luz contínua que sob escuro contínuo (Figura 1). Enquanto na testemunha, *B. cinerea* ocupou toda a placa (9 cm), seu crescimento reduziu-se em torno de 50% com adição do extrato do cultivo de *C. rosea* por 10 dias, sob luz contínua.

Supressão da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelo liofilizado

O liofilizado reduziu significativamente a germinação e o crescimento de *B. cinerea* ($P< 0,001$) (Figura 2). Comparativamente à testemunha, com a maior concentração do liofilizado, a germinação de conídios do patógeno reduziu-se mais que 90%, enquanto o crescimento micelial reduziu-se em quase 50%.

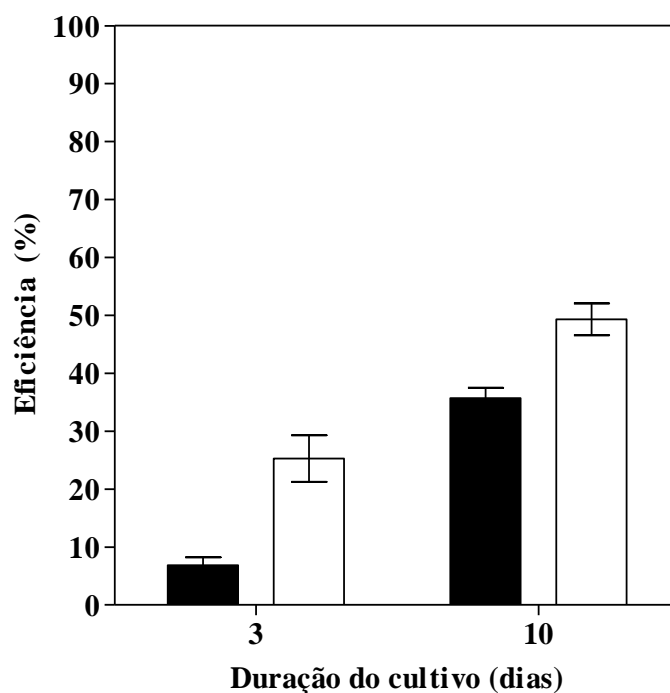


Figura 1: Eficiência em reduzir o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, do filtrado do cultivo de *Clonostachys rosea* em meio líquido de batata-dextrose, durante 3 e 10 dias, em condições de escuro (■) ou de luz contínuas (□). Médias de dez repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Supressão do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelo extrato orgânico

Os extratos orgânicos de *C. rosea* reduziram o crescimento micelial de *B. cinerea*, que foi inversamente proporcional ao aumento das concentrações, em todas as condições de crescimento do antagonista ($P < 0,001$) (Figura 3). O crescimento micelial do patógeno foi menor com os extratos do antagonista cultivado durante 10 dias, quando o cultivo sob condições de escuro ou luz não afetaram o crescimento ($P = 0,67$). Com os extratos obtidos aos 3 dias de cultivo de *C. rosea*, o crescimento do patógeno foi menor quando se cultivou o antagonista sob luz.

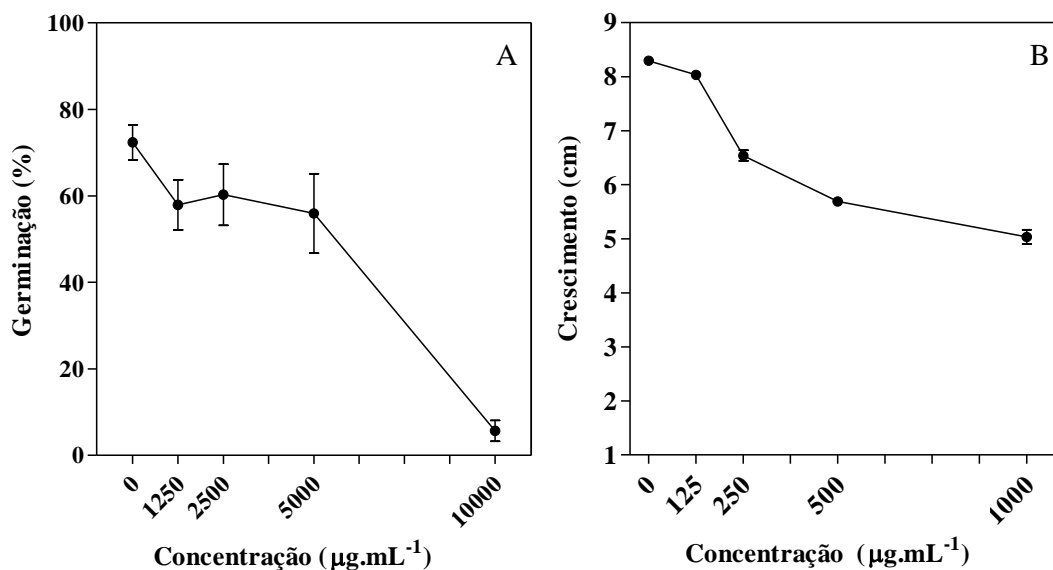


Figura 2: Germinação de conídios (A) e crescimento micelial (B) de *Botrytis cinerea* na presença de concentrações crescentes do liofilizado do filtrado do crescimento de *Clonostachys rosea* em meio líquido de batata-dextrose, durante 10 dias, com 12h de fotoperíodo. Médias de vinte repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média

Caracterização dos compostos do metabolismo secundário de *C. rosea*

Em todas as moléculas selecionadas para caracterização, havia mais que 100000 unidades de íons produzidos. Assim, detectaram-se 51 metabólitos do cultivo do antagonista em meio líquido: 19 politerpenóides (nove gisopreninas conhecidas e dez não conhecidas), 17 sorbicilinoídes (16 conhecidos e um não), cinco peptaibols (quatro conhecidos e um não), dois policetídeos e dois glicosídeos (similares a rosélipina), além de seis metabólitos de família(s) desconhecida(s) (Tabela 1).

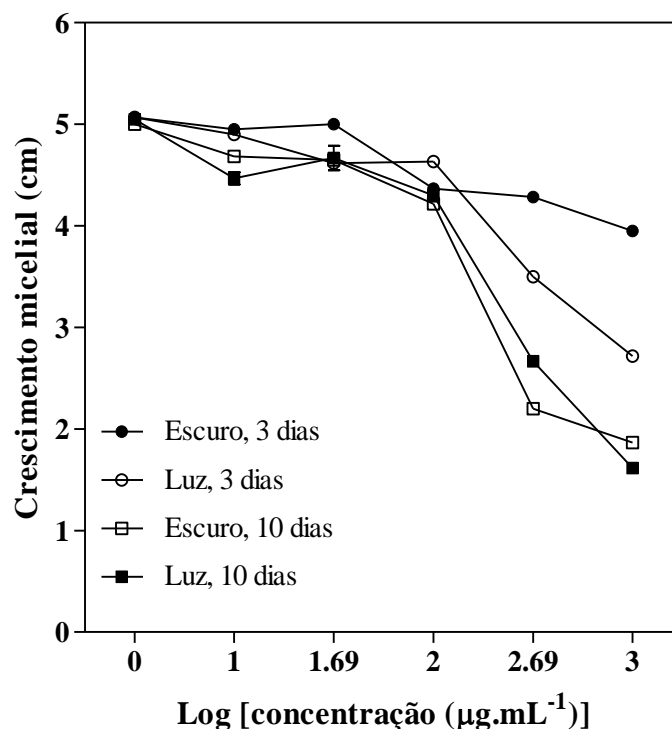


Figura 3: Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* na presença de concentrações crescentes do extrato orgânico extraído do cultivo de *Clonostachys rosea* em meio líquido de caldo batata-dextrose, durante 3 e 10 dias, em condições de escuro ou de luz contínuos. Médias de dez repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Quantitativamente, a condição de cultivo não afetou a detecção de metabólitos, os quais foram detectados em maior número aos 10 dias de cultivo: durante 3 dias, obtiveram-se 12 metabólitos sob luz e 10 sob escuro; aos 10 dias, detectaram-se 38 metabólitos sob luz e 39 sob escuro. Diferentemente das demais famílias, os peptaibols foram detectados após 3 dias de cultivo. Áreas de picos superiores a 10^6 , consequentemente de maior produção prevaleceram aos 10 dias, principalmente de sorbicilinoídes e sesquiterpenos.

Detectou-se maior produção de glisopreninas, inclusive de moléculas desconhecidas. Também se detectaram metabólitos desconhecidos dos demais grupos. Interessantemente, houve ocorrência de seis metabólitos em que não se conseguiu caracterizar a família.

Tabela 1: Famílias de metabólitos secundários produzidos por *Clonostachys rosea* NCR61/F, em meio líquido de batata-dextrose, em condições de luz ou de escuro contínuo durante 3 e 10 dias de cultivo; tempo de retenção (RT); e logaritmo da área do pico no cromatograma.

Família	Metabólito*	RT (min)	Fórmula molecular	Log (Área)			
				L3**	E3	L10	E10
Sorbicilinoídes	Bisorbicillinóide 1	7,5	C ₂₈ H ₃₂ O ₈	0	0	5,78	5,85
	Bisorbicillinóide 2	7,6	C ₂₈ H ₃₂ O ₈	0	0	6,32	6,41
	Bisorbicillinóide 3	7,6	C ₂₈ H ₃₂ O ₈	0	0	6,53	6,61
	Bisoxosorbicillinóide	7,2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	0	0	0	6,06
	Bisvertinoquinóide 1	7,8	C ₂₈ H ₃₄ O ₈	0	0	5,97	5,86
	Bisvertinoquinóide 2	7,9	C ₂₈ H ₃₄ O ₈	0	0	6,60	6,55
	Bisvertinoquinóide 3	8,3	C ₂₈ H ₃₄ O ₈	0	0	6,30	6,27
	Dihydrooxosorbiquinóide 1	8,5	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	0	0	6,34	6,35
	Dihydrooxosorbiquinóide 2	8,7	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	0	0	6,32	6,25
	Hydrosorbicillinóide	6,0	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	0	0	5,76	5,82
	Oxosorbicillinóide 1	5,7	C ₁₄ H ₁₆ O ₅	0	0	6,80	6,82
	Oxosorbicillinóide 2	8,5	C ₂₈ H ₃₂ O ₉	0	0	5,04	5,64
	Sorbicillina	8,0	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	0	0	0	5,69
	Sorbicillinóide	6,0	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	0	0	0	5,69
	Tetrahydrotrichodimerol	8,0	C ₂₈ H ₃₆ O ₈	0	0	6,05	5,86
	Tetrahydrotrichodimerol 2	8,4	C ₂₈ H ₃₆ O ₈	0	0	6,04	5,81

	Desconhecido 376	5,9	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	0	0	5,08	5,75
Politerpenóides	Glisoprenina A	10,7	C ₄₅ H ₈₂ O ₅	6,01	5,76	6,40	5,79
	Glisoprenina B	10,3	C ₄₅ H ₈₂ O ₆	5,23	0	5,95	5,03
	Glisoprenina C	7,8	C ₄₅ H ₈₄ O ₈	5,21	0	0	0
	Glisoprenina C1	8,1	C ₄₅ H ₈₄ O ₈	0	0	6,73	6,38
	Glisoprenina C2	8,3	C ₄₅ H ₈₄ O ₈	0	0	6,16	6,06
	Glisoprenina D	9,0	C ₄₅ H ₈₄ O ₇	6,17	5,98	6,50	6,09
	Glisoprenina E1	7,3	C ₄₅ H ₈₆ O ₉	6,08	6,05	6,72	6,66
	Glisoprenina E2	7,1	C ₄₅ H ₈₆ O ₉	0	0	6,72	0
	Glisoprenina F	7,8	C ₄₅ H ₈₆ O ₈	5,40	5,39	6,06	0
	Glisoprenina desconhecida 786-1	6,7	C ₄₅ H ₈₆ O ₁₀	0	0	6,06	5,71
	Glisoprenina desconhecida 786-2	7,0	C ₄₅ H ₈₆ O ₁₀	0	0	6,04	5,85
	Glisoprenina desconhecida 788	8,2	C ₄₅ H ₈₈ O ₁₀	5,87	5,85	6,31	6,30
	Glisoprenina desconhecida 708	8,9	C ₄₃ H ₈₀ O ₇	5,33	5,51	0	0
	Glisoprenina desconhecida 724	7,4	C ₄₃ H ₈₀ O ₈	0	0	6,02	5,88
	Glisoprenina desconhecida 734	9,3	C ₄₅ H ₈₂ O ₇	0	0	5,99	0
	Glisoprenina desconhecida 740	7,0	C ₄₃ H ₈₀ O ₉	0	0	5,80	5,63
	Glisoprenina desconhecida 768-1	7,6	C ₄₅ H ₈₄ O ₉	0	0	6,11	0
	Glisoprenina desconhecida 768-2	8,0	C ₄₅ H ₈₄ O ₉	0	0	5,91	5,82
Glisoprenina desconhecida 772	7,1	C ₄₅ H ₈₈ O ₉	0	0	5,77	0	

Peptídeos não ribossomais (Peptaibols)	<i>C. rosea</i> sequence#2	7,6	C ₉₄ H ₁₆₃ N ₂₁ O ₂₆	6,11	5,85	0	0
	<i>C. rosea</i> sequence#3	7,7	C ₉₅ H ₁₆₅ N ₂₁ O ₂₆	6,13	5,89	0	0
	<i>C. rosea</i> sequence#4	7,8	C ₉₅ H ₁₆₅ N ₂₁ O ₂₅	5,91	5,78	0	0
	Integramida A	9,5	C ₇₈ H ₁₃₄ N ₁₆ O ₂₁	0	5,06	0	0
	Peptaibol desconhecido 1322	10,1	C ₅₃ H ₁₁₄ N ₁₈ O ₂₀	5,28	0	0	0
Policetídeos	Koninginina B/E	6,4	C ₁₆ H ₂₆ O ₄	0	0	5,95	6,15
	Koninginina L/M	6,5	C ₁₆ H ₂₄ O ₄	0	0	5,61	5,84
Glicosídeos	Similar a Roselipina 1	8,5	C ₄₃ H ₇₄ O ₁₅	0	0	5,86	5,92
	Similar a Roselipina 2	8,6	C ₄₉ H ₆₈ O ₉	0	0	6,09	6,15
Não indentificado	Alcaloide desconhecido 447	5,8	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₈	0	0	0	5,75
	Não identificado 192	6,1	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	0	0	6,52	6,15
	Não identificado 196	6,2	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	0	0	0	5,76
	Não identificado 206	6,6	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	0	0	6,01	5,93
	Não identificado 296	6,8	C ₁₇ H ₂₈ O ₄	0	0	5,62	5,80
	Não identificado 597	6,3	C ₂₅ H ₃₉ N ₇ O ₁₀	0	0	0	5,75

*Números e letras à frente de compostos de mesmos nome e fórmula molecular indicam isomerismo. Números à frente dos compostos desconhecidos e não identificados indicam a massa nominal do metabólito.

**L3, E3, L10 e E10 = luz contínua/3dias, escuro contínuo/3 dias, luz contínua/10dias e escuro contínuo/10 dias, respectivamente.

Discussão

Avaliou-se o crescimento micelial de *B. cinerea* em três experimentos, com: i. filtrado do cultivo de *C. rosea*, ii. liofilizado desse cultivo e iii. extrato orgânico obtido do liofilizado. Nos três, cada um executado por duas vezes, houve supressão do crescimento micelial; em ii e iii, houve, também, supressão da germinação de conídios. Nos dois últimos experimentos, o efeito supressivo aumentou com o aumento da concentração do produto testado. Assim, confirmou-se a hipótese de que metabólitos resultantes do crescimento de *C. rosea* NCR61/F em meio líquido suprimem o crescimento e a germinação de conídios de *B. cinerea*. É notório que, mesmo após diluir-se o filtrado em dez vezes, o crescimento do patógeno em placas reduziu-se em quase 50%. Considerando-se que *C. rosea* é fungo necrotrófico (Schroer, 2001), competidor e micoparasita eficiente (Sutton et al, 1997), esperava-se que produzisse metabólitos secundários, para sobreviver nos diversos ecossistemas que habitam, como a maioria dos fungos necrotróficos (Zeilinger et al, 2016; Fox & Howlett, 2008, Keller et al., 2005, O'Brien & Wright, 2011). Já se constatou que o filtrado de crescimento de *C. rosea* BAF3874 em meio líquido inibiu o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodriguez et al., 2011). Os autores não determinaram o(s) compost(s) envolvido(s) na inibição, e sabe-se que, num substrato, *C. rosea* pode produzir enzimas hidrolíticas supressivas a patógenos (Mamarabadi et al., 2008, Li et al., 2006) e metabólitos secundários.

O filtrado e o extrato orgânico obtidos com o cultivo de *C. rosea* durante 10 dias foram mais supressivos a *B. cinerea* que os obtidos durante 3 dias. Na rotina da UCB, coletam-se conídios aos 10 dias de cultivo de *C. rosea*, quando há o máximo de crescimento e esporulação. Esse aspecto refletiu-se na execução dos experimentos, pois a filtração do meio líquido com crescimento fúngico aos 10 dias foi sempre mais difícil e demorada, com entupimento de membranas. Provavelmente, esse maior efeito reflita na maior produção de compostos, inclusive metabólitos secundários. Em fungos, a produção de compostos está associada à esporulação (Calvo et al., 2002), e como mencionado, aos 10 dias ocorre o máximo de esporulação de *C. rosea*. Vale mencionar que a fase orgânica, obtida do cultivo aos 10 dias, era amarelada, enquanto aquela aos 3 dias, translúcida. A presença de pigmentos amarelos pode estar associada à presença de bisorbicilinoídeos (Salo et al., 2016), que podem também ser produzidos por *Clonostachys* spp. (Zhai et al., 2016). Demandam-se mais ensaios, com maiores intervalos para otimizar o tempo ideal de cultivo do antagonista.

O efeito da condição luz/escuro no cultivo de *C. rosea* sobre a supressão do crescimento de *B. cinerea* foi variável. Houve maior supressão com 12 h de fotoperíodo,

para o filtrado, com 3 e 10 dias de cultivo e para o extrato, com 3 dias. Para o extrato, com 10 dias de cultivo, o efeito supressivo independeu da condição. Como em todos os aspectos do tetraedro de doença, o ambiente é importante na produção de metabólitos (Calvo et al., 2002) e a biossíntese de metabólitos secundários depende de fatores ambientais, como fonte de carbono e nitrogênio, temperatura ambiente, luz e pH (Keller et al., 2005). Vale mencionar que o co-cultivo de antagonista com outros microrganismos pode aumentar a produção de metabólitos ou induzir a produção de novos metabólitos (Degenkolb et al., 2002. Bertrand et al., 2013). Como mencionado, demandam-se ensaios subsequentes para averiguar o efeito de fatores do ambiente, inclusive com a presença de patógenos-presa, e otimizar o efeito do antagonista.

Confirmou-se a hipótese de que *C. rosea* NCR61/F produz metabólitos secundários. Assim, obtiveram-se 51 metabólitos com mais que 10^5 unidades de íons: 19 politerpenoides (glisopreninas), 17 sorbicilínóides (principalmente bisorbicillinol), cinco peptaibols, dois glicosídeos (similares a roselipina), dois policetídeos (Koninginina) e um alcaloide. Como se observa, destacou-se a produção de glisopreninas e sorbicilínóides. Em geral, a quantidade produzida foi maior com 10 dias de cultivo. Outros isolados de *C. rosea* também produzem metabólitos com ação antimicrobiana, como glisopreninas que inibiram a formação de apressórios de *Magnaporthe grisea* (Thines et al., 1998), peptaibols supressivos a *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodriguez et al., 2011), bissorbicilínóides com efeito antibacteriano (Zhai et al., 2016), roselipinas (Tabata et al., 1999); trioxipiperazina (gliocadina C) e resorcinol alcalino, com efeito nematicida (Song et al., 2016). Quando se sequenciou o genoma de *C. rosea* IK726, detectaram-se genes codificadores da síntese de policetídeos, peptídeos não ribossomais e terpenoides (Karlsson et al., 2015). Alguns destes metabólitos foram encontrados no presente trabalho. Vale destacar a detecção de moléculas indeterminadas em todas as famílias, bem como de cinco moléculas desconhecidas. Assim, demanda-se o aprofundamento dos estudos, para caracterizar estes compostos e para definir os metabólitos com efeito supressivo a *B. cinerea*.

Neste trabalho foram encontrados muitas famílias de metabólitos produzidos por *C. rosea* que são relacionados a inibição de fitopatógenos e muitas delas encontradas em espécies do gênero *Trichoderma* (Mukherjee et al., 2012). Curiosamente, quando comparado ao genoma a análise gnômica comparativa revelou que *C. rosea* possui menor número de genes relacionados produção de compostos tóxicos que *Trichoderma* spp. (Karlsson et al., 2015). O estilo de vida micoparásita apresentado por espécies de *Trichoderma* foi associada, principalmente, ao grande número de famílias de genes

associadas produção de enzimas líticas, responsáveis pela degradação de parede celular fúngica e na biossíntese de metabólitos secundários (Kubicek et al., 2011), ao passo que *C. rosea* apresenta em seu genoma, expansão no número de famílias de genes responsáveis pela detoxificação de moléculas responsáveis pela resistência anti-drogas, e adaptação do fungo em diferentes nichos (Karlsson et al., 2015). Apesar disso, os próprios autores revelam que embora sejam em menor número, *C. rosea* possui em seu genoma genes capazes de sintetizar compostos e enzimas supressivas à fitopatógenos. O grande número de metabólitos encontrados indica que a produção de metabólitos pode estar relacionados ao isolado e pode variar entre espécies. Demanda-se, compreender melhor a produção de cada composto e o papel na supressão de microrganismos, como *B. cinerea*.

Como conclusão, detectou-se que o isolado NCR61/F de *C. rosea* produz em cultivos *in vitro* compostos supressivos ao crescimento micelial e à germinação de conídios de *B. cinerea*. Provavelmente, estes compostos sejam metabólitos secundários, os quais sabidamente *C. rosea* pode produzir (Nygren et al. 2018). É importante ressaltar o ineditismo de informação para as condições brasileiras, pois, considerando-se os grupos que trabalham com o antagonista no país, é a primeira vez que se relatam esses compostos. Como essa produção pode ser específica e a nível de estirpe fúngica (Calvo et al. 2002; Nygren et al. 2018), demanda-se avaliar os outros três isolados de *C. rosea* obtidos no Brasil (Nobre et al., 2005), quanto à quantidade e qualidade de compostos produzidos. Demanda-se, também, otimizar as condições para produção, avançar na caracterização química das moléculas e definir o grau de associação dessas moléculas ao antagonismo e à interação *C. rosea* - *B. cinerea* - tomateiro. Quanto à caracterização química, já se conhece a maioria dos compostos produzidos, mas demanda-se elucidar a natureza dos compostos de família indefinida: são compostos novos? Como em qualquer investigação científica, dúvidas persistem e se geram novas perguntas. De qualquer forma, considera-se que se obtiveram resultados importantes e que os passos dados foram cruciais em expandir o leque de mecanismos de antagonismo dos isolados brasileiros de *C. rosea* a *B. cinerea*.

Referências bibliográficas

Bertrand S, Schumpp O, Bohni N, Monod M, Gindro K, Wolfender JL. 2013. De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *Journal Natural Products* 76: 1157–1165.

- Borges ÁV, Saraiva RM, Maffia LA. 2015. Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 40:71-76.
- Calvo, AM, Wilson, RA, Bok, JW, Keller, NP. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Review* 66: 447–459.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF. 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46:515-22
- Degenkolb T, Heinze S, Schlegel B, Strobel G, Grafe U. 2002. Formation of new lipoaminopeptides, acremostatins A, B, and C, by co-cultivation of *Acremonium* sp.Tbp-5 and *Mycogone rosea* DSM 12973. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 66: 883-886.
- Fox EM, Howlett BJ. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* 11:481-4877
- Karlsson M, Durling MB, Choi J, Kosawang C, Lackner G, et al. 2015. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biology and Evolution* 7:465-80
- Keller NP, Turner G, Bennett JW. 2005. Fungal secondary metabolism -from biochemistry to genomics. *Nature Review Microbiology* 3:937–947.
- Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK *et al.* 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* 12:R40.
- Laatsch H. 2013. *Antibase 2013 SciDex v. 1.2.470 – The Natural Compounds Identifier*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Li J, Yang J, Huang X, Zhang K-Q. 2006. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry* 41:925-929.
- Macheleidt J, Mattern DJ, Fischer J, Netzker T, Weber J, Schroeckh V, Valiante V, Brakhage AA. 2016. *Annual Review of Genetics* 50:371-392.
- Mamarabadi M, Jensen B, Jensen DF, Lübeck M. 2008. Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. *FEMS Microbiology Letters* 285:101-110.

- Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* 158:35-45.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34:132-43.
- Nygren K, Dubey M, Zapparata A, Iqbal M, Tzelepis GD, Durling MB, Jensens DF, Karlsson M. 2018. The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey. *Evolutionary Applications*. Published online. Doi: 10.1111/eva.12609
- O'Brien J, Wright GD. 2011. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion Biotechnology* 22:552–558.
- Rodriguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110:1177-86
- Romero D, Traxler MF, López D, Kolter R. 2011. Antibiotics as signal molecules. *Chemistry Review* 111:5492–5505.
- Salo O, Guzmán-Chávez F, Ries MI, Lankhorst PP, Bovenberg RA, Vreeken RJ, Driessen AJ. 2016. Identification of a polyketide synthase involved in sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Applied Environmental Microbiology* 82: 3971–3978.
- Saraiva RM, Borges AV, Macedo PEF, Maffia LA. 2014. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole. *Revista de Ciências Agrícolas* 31: 78 – 91.
- Schroers HJ. 2001. A Monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and Its *Clonostachys* Anamorphs. *Studies in Mycology* 46.
- Song HC, Shen WY, Dong JY. 2016. Nematicidal metabolites from *Gliocladium roseum* YMF1.00133. *Applied Biochemistry and Microbiology* 52:324-30
- Sterner O, Thines E, Eilbert F, Anke H. 1998. Glisoprenins C, D and E, new inhibitors of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, from cultures of *Gliocladium roseum*. 2. Structure determination. *The Journal of Antibiotics* 51:228-31
- Sutton JC, Li D-W, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM. 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81:316-28.

- Tabata N, Ohyama Y, Tomoda H, Abe T, Namikoshi M, Omura S. 1999. Structure elucidation of roselipins, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase produced by *Gliocladium roseum* KF-1040. *Journal Antibiotic* (Tokyo) 52:815-26.
- Thines E, Eilbert F, Anke H, Sterner O. 1998. Glisoprenins C, D and E, new inhibitors of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, from cultures of *Gliocladium roseum*. 1. Production and biological activities. *The Journal of Antibiotics* 51:117-22
- Thines E, Eilberta F, Sternerb O, Ankea H. 1997. Glisoprenin A, an inhibitor of the signal transduction pathway leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea* on hydrophobic surfaces. *FEMS Microbiology Letters* 151: 219-224.
- Vipul K, Mohammad S, Muksesh S, Sonika P, Anuradha S, Sharna A. 2014. Role of secondary metabolites produced by commercial *Trichoderma* species and their effect against soil borne pathogens. *Biosensors Journal* 3:108.
- Zeilinger, S, Gruber S, Bansal, R; Mukherjee, P K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma*-Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Rev* 30: 74-90.
- Zhai MM, Qi FM, Li J, Jiang CX, Hou Y, Shi YP, Di DL, Zhang JW, Wu QX. 2016. Isolation of secondary metabolites from the soil-derived fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 2298–2306.

Capítulo 2

Sobrevivência de *Clonostachys rosea* no filoplano, rizosfera e rizoplano de tomateiro

Resumo

Clonostachys rosea é um agente de controle biológico versátil e conhecem-se vários aspectos de sua ecologia. A dinâmica temporal da sobrevivência do fungo em tecidos de tomateiro é incompreendida e de importância para delimitar intervalos de aplicação e a eficiência do antagonista. Portanto, objetivou-se quantificar a sobrevivência de *C. rosea* no filoplano, rizoplano e rizosfera de tomateiros. O antagonista sobreviveu nos três locais, durante todo o período experimental, 48 dias após aplicado. A sobrevivência nas superfícies foliares e radiculares diminuiu com o tempo, mas manteve-se constante na rizosfera. O fungo colonizou tecidos da base do caule e raízes de tomateiro até 48 dias após a aplicação. Este resultado é importante para determinar a sobrevivência do antagonista em tomateiro e determinar estratégias de aplicação de *C. rosea* para o controle biológico de *B. cinerea*.

Introdução

Clonostachys rosea é um antagonista eficiente de vários fitopatógenos. O fungo pode ser encontrado em diferentes ecossistemas, desérticos ou tropicais em diferentes regiões do mundo (Sutton et al., 1997). Como saprófita, coloniza a matéria orgânica do solo, onde compete com microrganismos nesses nichos, o que propicia seu uso no manejo de doenças causadas por fungos que sobrevivam e esporulem em restos culturais, como *Botrytis cinerea* (Morandi et al., 2003). Na parte aérea de plantas, o antagonista pode colonizar endofiticamente, vagens, folhas e flores de diferentes plantas, sem causar doença (Sutton et al., 1997).

Como importante competidor, o fungo estabelece-se eficientemente em diferentes locais da planta e em restos culturais, onde exerce o antagonismo a fitopatógenos. Isolados selecionados em condições brasileiras, foram testados no controle de *B. cinerea* em roseira, morangueiro, eucalipto e tomateiro (Nobre et al., 2005). Esses isolados colonizaram morangueiros e reduziram a esporulação de *B. cinerea* em diferentes regimes de molhamento foliar (Cota et al., 2008a). Para os autores, a eficiência de controle até 10 °C foi baixa e alta quando próximo a 25 °C. No campo, o antagonista controlou o patógeno em folhas, flores e frutos de morango, mesmo com média de 16°C (Cota et al., 2008b). Em tomateiro, com a aplicação preventiva do antagonista, e em maior frequência,

suprimiu-se a doença em condições controladas (Borges et al., 2015). Sob microscopia confocal, observaram-se a colonização de tecidos vegetais de hastes, folhas e raízes pelo antagonista e na interação com *B. cinerea* (Saraiva et al., 2014). Na maioria dos casos, a sobrevivência foi medida indiretamente e relacionada a a capacidade de colonização de tecidos senescentes e a esporulação do antagonista nesses tecidos, após algum tempo. A dinâmica da sobrevivência de propágulos pós aplicação ainda é desconhecida.

Para que tenham sucesso, agentes de controle biológico precisam sobreviver sob condições variáveis (Cota et al., 2008); vários fatores físicos, químicos e biológicos podem influenciar a sobrevivência de microrganismos. Para os agentes de controle biológico, o filoplano é um ambiente desafiador onde enfrentam flutuações de temperatura e umidade, déficit de água livre, ação dos ventos e da radiação (Costa et al., 2012). O ambiente foliar é diferente do ambiente do solo (Garbeva et al., 2004). Apesar das condições mais tamponadas do solo, aspectos físicos, como pH, presença de ácidos orgânicos e nutrientes, e biológicos, como a competição de microrganismos, podem ser determinantes ao estabelecimento de antagonistas.

As aplicações de agentes de controle, geralmente associadas ao controle biológico inundativo, requerem presença massal de propágulos para que o antagonismo ocorra rapidamente, ocorra maior proteção de sítios de infecção e os antagonistas sobrevivam por longo tempo (Cook, 1993). É possível que, mesmo em baixas concentrações de propágulos ou sob condições de estresse, obtenha-se controle biológico eficiente (Nobre et al., 2005; Morandi et al., 2008; Nechet et al., 2017), o que não se obtém para todos os hospedeiros (Costa et al., 2013). Assim, é importante a dinâmica da sobrevivência de antagonistas nos diferentes sítios de atuação, para auxiliar a definir intervalos e estratégias de aplicação.

Na Unidade de Controle Biológico (UCB), vem-se avaliando a eficiência de *C. rosea* no biocontrole de *B. cinerea* desde a década de 1990. Como mencionado, já se obtiveram resultados positivos em vários hospedeiros. Vem-se estudando, também, aspectos autoecológicos do antagonista, e se obtiveram resultados contraditórios quanto à sobrevivência na parte aérea de hospedeiros e no solo. Assim, delineou-se este trabalho, que objetivou quantificar a sobrevivência de *C. rosea* no filoplano, rizoplano e rizosfera de tomateiros.

Metodologia

Os experimentos ocorreram na UCB e casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Cultivaram-se tomateiros grupo Santa Clara em vasos de 4 L, em substrato com proporção de 3L de solo de terriço, 1L de esterco bovino curtido, 20.8g de Osmocote® e 10.4g de Yoorin®, em casa de vegetação (25±2°C).

Usou-se o isolado NCR61/F de *C. rosea* (Nobre et al., 2005). Cultivou-se o fungo em arroz em sacos de polipropileno com filtro, a 25°C, sob luz fluorescente e 12 h de fotoperíodo. Diariamente, revolveram-se os sacos para desfragmentar o micélio e facilitar a colonização. Após 10 dias, adicionou-se água destilada esterilizada (ADE) (250mL/saco, aproximadamente) e Tween 80 (0,05% v/v). Agitou-se vigorosamente a mistura, filtrou-se em camada dupla de gaze, e com auxílio de hemacitômetro, ajustou-se a suspensão para 10⁷ conídios de *C. rosea*.mL⁻¹, que foi usada nos experimentos que se seguem, cada um executado por duas vezes.

Sobrevivência no filoplano de tomateiros

Aos 50 dias do transplântio, no início do florescimento, no terço médio-superior de cada tomateiro, marcaram-se aleatoriamente folíolos de tamanho uniforme. Em seis plantas, com ajuda de um atomizador Tween nº15 aplicou-se em toda a superfície das plantas a suspensão de conídios e, em seis, ADE. Coletaram-se seis folíolos de cada planta aos 30 min após a aplicação (dia 0) e aos 3, 6, 12, 24 e 48 dias após. As coletas ocorreram nas mesmas plantas, as quais foram distribuídas ao acaso na bancada, onde permaneceram durante todo o experimento. Transferiram-se os folíolos para 30 mL de tampão fosfato salino (PBS), em tubos de 50mL tipo Falcon, os quais foram agitados em vortex (1 min) e sonicados (10 min). De cada tubo, retirou-se 1 mL, que foi transferido para novo tubo com 9mL de PBS (10⁻¹), e se diluiu sucessivamente até atingir 10⁻⁴. Transferiu-se 0,2mL para meio semi-seletivo (Park et al., 1992) em placas de Petri de 90mm (três placas por diluição), que foram mantidas a 25°C, no escuro. Após 5 dias, avaliou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. rosea* em cada placa, adotando-se o intervalo de contagem de 30-300 colônias por placa (Bennett et al., 2003). Assim, o limite de detecção foi o de 30 UFC.mL⁻¹ na solução de lavagem inicial dos folíolos. Quando necessário, efetuaram-se lâminas e isolamento para confirmar a colônia como sendo de *C. rosea*.

Sobrevivência na rizosfera e rizoplano de tomateiros

Plantaram-se sementes em substrato, em bandejas de isopor de 144 células. Aos 20 dias do semeio, dez mudas foram retiradas, tiveram as raízes lavadas em água corrente e transplantadas para o substrato peneirado em peneiras de 20 Mesh, para facilitar a coleta

de amostras, em vasos de 2L. Após 5 dias, ao redor de cinco plantas aplicaram-se, homogeneamente, 200 mL da suspensão de conídios e ao redor de outras cinco plantas, aplicou-se 200 mL de ADE. Coletaram-se o substrato ao redor das raízes (rizosférico), sistema radicular e substrato aderido (rizoplano) e a parte aérea das plantas 1h após a aplicação (dia 0) e após 3, 6, 12, 24 e 48 dias. Retirou-se o excesso de substrato das raízes, que foram pesadas e transferidas para 30 mL de PBS em tubos Falcon de 50mL, os quais foram agitados em vortex (1 min) e sonicados (10 min), e se efetuou diluição seriada até 10^{-4} , como anteriormente. Do substrato rizosférico, transferiu-se 1g para 9mL de PBS em tubos (10^{-1}), homogeneizou-se e diluiu-se sucessivamente até 10^{-4} . De cada diluição das amostras de raízes e substrato, transferiram-se 0,2mL para meio semi-seletivo (Park et al,1992) em placas de Petri (três placas por diluição), que foram mantidas a 25°C, no escuro. Após 5 dias, avaliou-se o número de unidades formadas de colônia (UFC), adotando-se os mesmos padrões do experimento anterior.

Para avaliar a colonização endofítica, lavaram-se as raízes e parte aérea das plantas, as quais foram imersas em álcool 70% (30s), hipoclorito de sódio 1% (1min), lavadas por três vezes em ADE e secados em papel filtro sob câmara de fluxo laminar. Fragmentaram-se as raízes e, de cada planta, transferiram-se cinco fragmentos de 0,5cm de comprimento para meio paraquat-cloramfenicol-ágar (PCA) em placas de Petri, que foram mantidas a 25°C, sob luz fluorescente, 12 h de fotoperíodo. Fragmentos de raízes não sanitizadas, também foram semeados em PCA. Após 10 dias, avaliou-se a presença de *C. rosea*. Da parte aérea das plantas, obtiveram-se fragmentos da base (interseção com o sistema radicular), nó cotiledonar, folha cotiledonar, caule e folhas (terços médio e superior da planta). Do caule, obtiveram-se fragmentos com 3mm de espessura e, das folhas, com 0,5cm². Transferiram-se os fragmentos para meio PCA, e se avaliou como anteriormente.

Resultados

Sobrevivência no filoplano de tomateiros

Clonostachys rosea sobreviveu no filoplano até os 48 dias após aplicado (Figura 4). A população do antagonista foi reduzida abruptamente aos 3 dias após a aplicação; posteriormente, a redução foi gradual e mais lenta, até o final das avaliações. Na última, em média, havia mais que 70 UFC.mL⁻¹ na suspensão de lavagem dos folíolos. Colônias de *C. rosea* desenvolveram-se nas placas feitas a partir das plantas-testemunha aos 12 dias após a aplicação. Como o número de colônias foi sempre menor que 30, abaixo do limite de detecção, as contagens não foram consideradas nas análises.

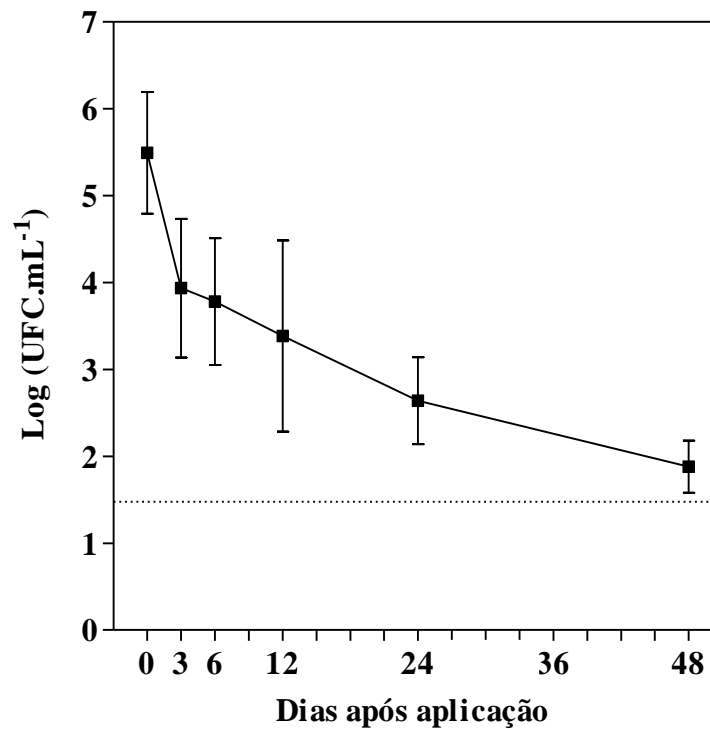


Figura 4: Unidades formadoras de colônia (UFC) de *Clonostachys rosea* na suspensão de lavagem de folíolos de tomateiros, em diferentes intervalos após aplicação do antagonista. Médias de dez repetições. Linha tracejada na horizontal representa o limite de detecção da técnica. Barras verticais representam o desvio padrão da média.

Sobrevivência no rizoplano de tomateiros

Clonostachys rosea sobreviveu na rizosfera e rizoplano após ser aplicado no substrato de cultivo (Figura 5). Na rizosfera, a população do antagonista manteve-se estável durante os 48 dias de avaliação, e houve variabilidade na contagem de UFC. No rizoplano, a população reduziu-se ao longo do período avaliado. Nas duas últimas avaliações, colônias de *C. rosea* ocorreram em placas das plantas-testemunha, mas o número de UFC foi sempre abaixo do limite de detecção adotado.

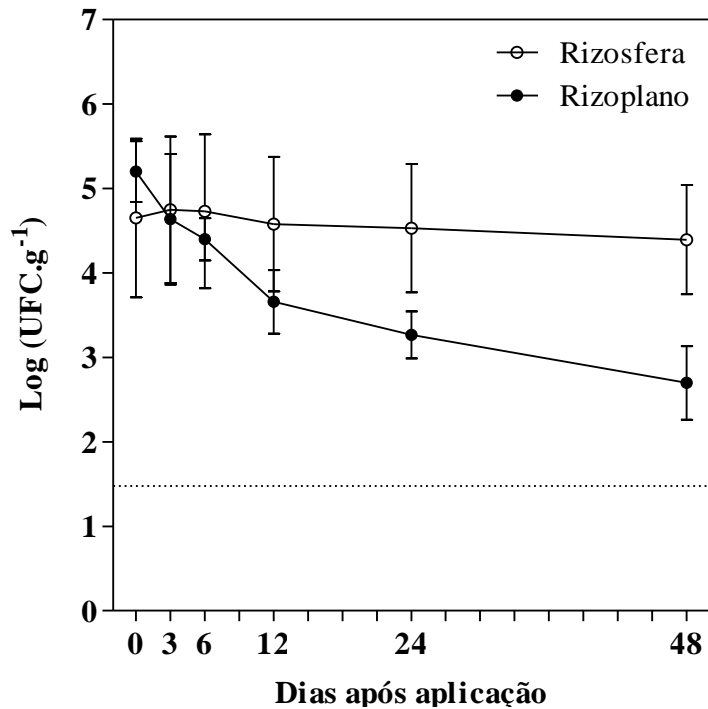


Figura 5: Unidades formadoras de colônia (UFC) de *Clonostachys rosea* na solução preparada a partir do substrato e do sistema radicular de tomateiro em diferentes intervalos após aplicação do antagonista. Médias de dez repetições. Linha tracejada na horizontal representa o limite de detecção da técnica. Barras verticais representam o desvio padrão da média.

Colonização do tomateiro

A partir do terceiro dia após a aplicação, recuperou-se *C. rosea* de todos os fragmentos da interseção do caule-sistema radicular. Exceto na última coleta, recuperou-se o antagonista em 80% dos fragmentos (figura 6). *Clonostachys rosea* também foi recuperado de fragmentos do nó cotiledonar (região do hipocótilo) entre 3 e 24 dias após a aplicação. O número de fragmentos do nó cotiledonar colonizados foi máximo aos 3 e 6 dias, mas decresceu e foi 40% na coleta do dia 24. No dia 48, detectou-se colonização apenas em fragmentos na interseção caule-sistema radicular. Não se detectou colonização do caule e das folhas nos terços médio e superior em qualquer época amostrada. O mesmo ocorreu para todas as amostras de fragmentos das plantas- testemunha.

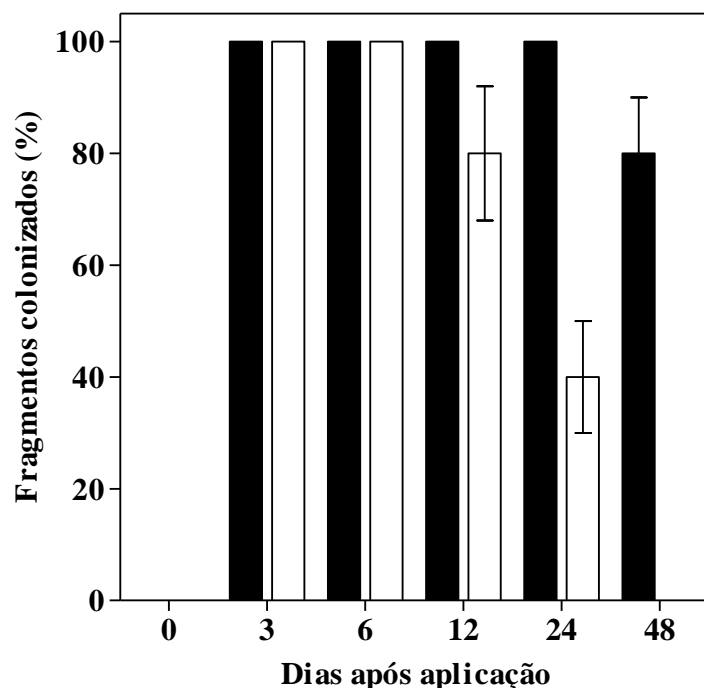


Figura 6: Fragmentos de plantas de tomateiro da interseção do caule com a raiz (■) e do nó cotiledonar (□), colonizados por *C. rosea*, coletados aos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 dias após aplicação do antagonista no substrato de plantio. Média de 5 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Quanto ao sistema radicular, dos fragmentos não sanitizados recuperou-se *C. rosea* em média superior a 50% de todos os fragmentos em todas as épocas. A recuperação do antagonista nos fragmentos aumentou-se até 12 dias após aplicação; após 24 e 48 dias, recuperaram-se de 60 e 40%, respectivamente. Nos fragmentos sanitizados, no dia 0 não se recuperou o antagonista. Nos dias 3, 6, 12, 24 e 48, obtiveram-se 12, 28, 24, 16 e 18% dos fragmentos colonizados (figura 7). Similar ao ocorrido na parte aérea, não se visualizou o antagonista em quaisquer amostras das plantas-testemunha.

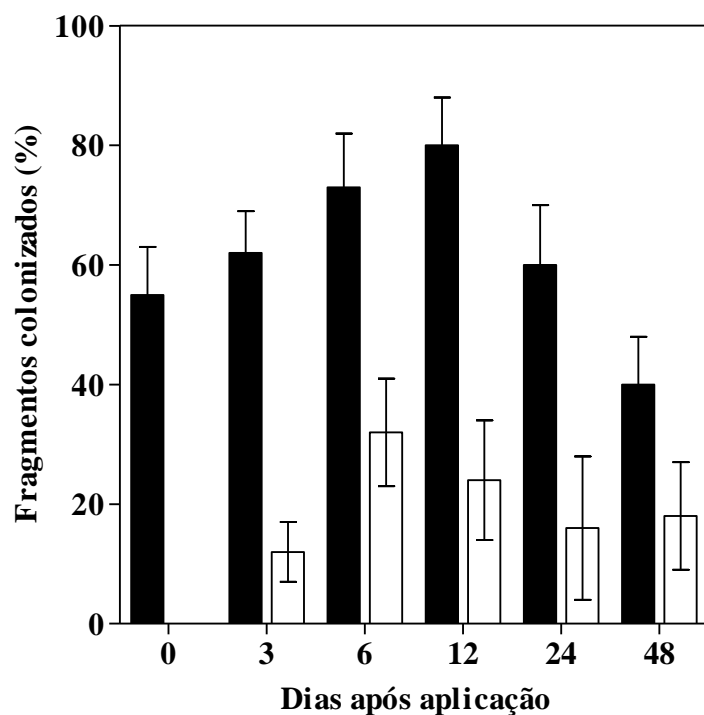


Figura 7: Fragmentos de raízes, não-sanitizados (■) e sanitizados (□), colonizados por *C. rosea* e coletados aos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 dias após aplicação do antagonista no substrato de plantio. Média de 5 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Discussão

A versatilidade, competitividade e antagonismo de *C. rosea* são bem conhecidos (Sutton et al., 1997). Além do antagonismo dos quatro isolados brasileiros de *C. rosea* (Nobre et al., 2005) a *B. cinerea*, comprovado em morango e tomateiro (Cota et al., 2008ab; Borges et al., 2015), as observações quanto à sobrevivência desses isolados, associados ou não a tomateiros eram inconclusivas. Durante 48 dias de avaliação, *C. rosea* isolado NCR61/F sobreviveu no filoplano, rizosfera e rizoplano de tomateiros.

No filoplano, a sobrevivência reduziu-se ao longo das avaliações, fato aparentemente comum para fungos antagonistas no filoplano (Köhl et al. 2000; Guetsky et al. 2002; Freeman et al. 2004, Cota et al., 2008a). No presente trabalho, a sobrevivência reduziu-se mais abruptamente aos 3 dias após a aplicação. A colonização de tecidos foliares de morangueiro pelos isolados brasileiros de *C. rosea* reduziu-se ao longo de 49 dias, com maior taxa de redução até 14 dias após aplicados (Cota et al., 2008a). Redução abrupta nas populações de isolados de *Trichoderma harzianum*, *T. hamatum*, *T. atroviride* e *T. longibrachiatum* também ocorreram nos primeiros 3 dias após aplicados em morangueiros em casa de vegetação (Freeman et al., 2004). Espera-se haver queda abrupta na sobrevivência desses fungos, considerando-se que os esporos, inicialmente

protegidos no ambiente de cultivo *in vitro*, são transportados para o ambiente hostil do filoplano, onde a baixa disponibilidade de nutrientes e água livre provocam a morte de grande parte dos esporos antes mesmo de germinarem (Papavizas, 1985). Há que se considerar aspectos bióticos - como a microbiota residente, químicos - como exsudatos foliares, e físicos - como a umidade relativa (Cota et al., 2008a) e a radiação ultravioleta (Costa et al., 2012, 2013). Mesmo sob condições ambientais adversas, o antagonista pode manter o antagonismo e suprimir o patógeno (Morandi, et al., 2008), em vista de sua versatilidade e competitividade. É importante, ainda, analisar a relação entre quantidade de esporos do antagonista que sobrevivem e a eficiência do biocontrole no filoplano. Quando se selecionaram os isolados do antagonista, com aplicação de 10^3 conídios.mL⁻¹ suprimiu-se a esporulação de *B. cinerea* em folhas de tomateiro (Nobre et al., 2005). Assim, a princípio, poder-se-ia proteger o tomateiro e controlar *B. cinerea* com intervalos de aplicação entre 12 a 18 dias. Essa observação proveio de ensaios *in vitro*, e demandam-se ensaios em casa de vegetação para validá-la.

O antagonista também sobreviveu na rizosfera, onde a população tendeu a permanecer estável, e no rizoplano, onde decresceu. Quando se estudou a sobrevivência de outros isolados de *C. rosea* no solo, verificou-se tendência de aumento de população na rizosfera e rizoplano de cenoura e cebola (Bennett et al., 2008) ou de ervilha (Xue, 2003) e de redução em raízes de pepino (Chatterton et al., 2008, Chatterton & Punja, 2010). Comumente, há problemas de amostragem em estudos com microrganismos do/no solo, o que pode levar à divergência de resultados. No presente trabalho, a redução populacional de *C. rosea* no rizoplano, pode-se dever à amostragem: inicialmente, quando o volume radicular era pequeno, amostravam-se as raízes como um todo; a partir de 12 dias, com o crescimento massal, pode-se ter amostrado regiões das raízes não ocupadas pelo fungo. Para a rizosfera, sempre se procurava amostrar o substrato ao redor do colo da planta, o que pode ter sido mais representativo. É curioso que o número de fragmentos colonizados pelo antagonista aumentou até os 24 dias após a aplicação, mas a intensidade de colonização diminuiu. O estudo da colonização por meio de UFC.grama⁻¹ pode, também, ter levado a um problema de representação. De qualquer forma, a população de *C. rosea* no solo pode reduzir ao longo do tempo. Este fato foi observado para *Trichoderma* spp., segundo os autores porque os conídios foram aplicados ao solo sem adição de nutrientes (Papavizas, 1981, 1985; Beagle-Ristaino & Papavizas, 1985). No presente trabalho, também se aplicou *C. rosea* sem adição de quaisquer nutrientes exógenos, que não a matéria orgânica do próprio substrato.

Fato importante é que, após aplicado no substrato de cultivo, *C. rosea* colonizou raízes, a interseção caule-raiz e mesmo o nó cotiledonar (região do hipocótilo). Já se observou colonização da região da coroa da raiz e do hipocótilo pelo antagonista (Xue 2003; Chatterton et al., 2008). Apesar de colonizar hastes e raízes mais eficientemente que folhas (Saraiva et al., 2015), não se esperava haver colonização sistêmica das plantas, considerando-se que o antagonista permanece nas camadas superficiais da epiderme (Saraiva, et al., 2015). De qualquer forma, *C. rosea* pode se estabelecer endofítica e epifiticamente em órgãos de plantas (Sutton et al., 1997, Nobre et al., 2005). Esse fato foi novamente constatado no presente trabalho, agora em tomateiro.

Em conclusão, *C. rosea* sobrevive por até 48 dias nas superfícies foliar e radicular, bem como na rizosfera do tomateiro. O número de propágulos ativos na superfície foliar até 12 dias da aplicação pode propiciar a proteção dos órgãos. Demandam-se estudos em casa de vegetação para se certificar de que essa tendência persiste e, principalmente, para se avaliar a sobrevivência em hastes feridas, sítios preferenciais de infecção por *B. cinerea* em tomateiros (Borges et al. 2015). Na rizosfera, os propágulos do fungo permaneceram em concentração similar à aplicada inicialmente, e se espera que possam assegurar a proteção das raízes a eventuais patógenos. A sobrevivência de *C. rosea* no solo e na superfície da planta poderia ser aumentada, com a adição de nutrientes à suspensão de conídios ou o encapsulamento dos mesmos, para fornecer nutrientes exógenos (Shaban & El-Komy, 2001). Em condições de casa de vegetação, ambiente mais propício a epidemias de *B. cinerea* em tomateiro, o uso de cobertura plástica de polietileno contendo bloqueadores de raios UV-B (Costa et al., 2013) e o maior controle da temperatura e umidade poderiam aumentar a sobrevivência do fungo na superfície foliar. Enfim, este trabalho apresenta o comportamento do antagonista nos diferentes órgãos da planta. Como mencionado, já se conheciam vários aspectos autoecológicos relacionados aos isolados brasileiros de *C. rosea*. Com o presente estudo, preenche-se uma lacuna importante para o acervo de conhecimentos sobre o antagonista.

Referências bibliográficas

- Beagle-Ristaino JE, Papavizas GC. 1985. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. *Phytopathology* 75, 729- 732.
- Bennett AJ, Leifert C, Whipps JM. 2003. Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1565-1573.

- Bennett AJ, Whipps JM. 2008. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. *Biological Control* 44:349-361.
- Borges ÁV, Saraiva RM, Maffia LA. 2015. Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 40:71-6.
- Chatterton S, Jayaraman J, K. Punja Z. 2008. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea f. catenulata*. *Biological Control* 46:267-278.
- Chatterton S, Punja ZK. 2010. Factors influencing colonization of cucumber roots by *Clonostachys rosea f. catenulata*, a biological disease control agent. *Biocontrol Science and Technology* 20:37-55.
- Cook RJ. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31:53-80.
- Costa LB, Rangel DEN, Morandi MAB, Bettioli W. 2012. Impact of UV-B radiation on *Clonostachys rosea* germination and growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:2497-504.
- Costa LB, Rangel DEN, Morandi MAB, Bettioli W. 2013. Effects of UV-B radiation on the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* to *Botrytis cinerea* on strawberry leaves. *Biological Control* 65:95-100.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF. 2008a. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46:515-22.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG. 2008b. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. *Letters in Applied Microbiology* 46:312-7.
- Freeman S, Minz D, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, et al. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110:361-70.
- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42:243-70.
- Guetsky R, Elad Y, Shtienberg D, Dinor A. 2002. Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology* 12:705-714.
- Köhl J, Gerlagh M, Grit G. 2000. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production systems of cyclamen. *Plant Disease* 84: 569-573.

- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG. 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26:311-7.
- Morandi MAB, Mattos LPV, Santos ER, Bonugli RC, 2008. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* 27: 77-83.
- Nechet KL, Vilela ESD, Heck DW, Terao D, Halfeld-Vieira BA. 2017. Effect of increased UV-B radiation on biological control of the gray mold by *Clonostachys rosea* and on the expression of strawberry defense-related enzymes. *Australasian Plant Pathology* 46:107-13.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34:132-43
- Papavizas GC, 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosphere. *Phytopathology* 71: 121-125.
- Papavizas GC, 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54.
- Park YH, Stack JP, Kenerly CM. 1992. Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Disease* 76:230-235.
- Saraiva RM, Czymmek KJ, Borges ÁV, Caires NP, Maffia LA. 2015. Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. *Biocontrol Science and Technology* 25:56-71.
- Shaban GM, EI-Komy HM. 2001. Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* 151:139-46.
- Sutton JC, Li D-W, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM. 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81:316-28
- Xue AG. 2003. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93:329-35.

Capítulo 3

Microbiota foliar de tomateiro versus aplicação de *Clonostachys rosea* NCR61/F

Resumo

Clonostachys rosea é antagonista eficiente de *Botrytis cinerea* em vários hospedeiros, mas as relações do antagonista com comunidades microbianas na parte aérea são inexploradas. Assim, objetivou-se investigar se a aplicação de *C. rosea* na parte aérea de tomateiros afeta a microbiota foliar. A aplicação de *C. rosea* reduziu a diversidade da comunidade fúngica epifítica, até 12 dias, e da comunidade endofítica até 3 dias após a aplicação. Para a comunidade bacteriana epifítica, a diversidade reduziu-se, aos 3 e 12 dias após a aplicação. As comunidades fúngicas (epífitas e endófitas) de plantas tratadas com *C. rosea* foram diferentes das não tratadas, até 3 dias após a aplicação, e semelhantes nos demais períodos. A comunidade bacteriana epifítica de plantas tratadas com *C. rosea* diferiu da comunidade de plantas não tratadas aos 3 dias da aplicação, e foi semelhante nos demais períodos. Apesar dessas diferenças, em todas as comunidades afetadas, houve resiliência da microbiota, com aumento da diversidade e diminuição de distâncias entre comunidades tratadas ou não com o antagonista. A abundância de filos e gêneros epifíticos (bacterianos e fúngicos) foi significativamente menor nas plantas tratadas com *C. rosea*, principalmente nos dias iniciais após a aplicação. Os gêneros mais abundante em folhas de tomateiro foram *Cladosporium* (Ascomycota), *Acinetobacter* (Proteobacteria) e *Planifilum* (Firmicutes). Conclui-se que a aplicação de *C. rosea* alterou a microbiota de folhas de tomateiro mas o efeito ocorreu apenas nos primeiros dias da aplicação e foi transiente. Esse trabalho é inédito no Brasil e abre avenidas para novos estudos sobre interações de agentes de controle biológico-microbiota de plantas e poderemos definir estratégias para aumentar a eficiência do controle biológico de fitopatógenos.

Introdução

O controle biológico tem sido ferramenta importante no manejo de doenças de plantas, e o uso de agentes de controle biológico (acb) atende à demanda crescente por tecnologias sustentáveis e eficientes de controle (Pal & Gardener, 2006). Embora haja consenso sobre os benefícios do uso de acb na agricultura, pouco se conhece sobre os efeitos não-alvo das aplicações desses agentes no microbioma de plantas. Em vista dos mecanismos de antagonismo – principalmente antibiose, hiperparasitismo e competição – pode-se esperar que antagonistas a fitopatógenos causem perturbações nas comunidades microbianas, como a redução na diversidade e/ou abundância de outros fungos no

ecossistema (Brimer & Boland, 2003, Winding et al., 2004). Essa indagação é importante e demanda avaliação, aliada àquela de eficiência de um acb.

Entre os acb eficientes que possuem os mecanismos mencionados acima, encontra-se *Clonostachys rosea*. Além de antibiose, competição e hiperparasitismo, *C. rosea* também pode produzir enzimas hidrolíticas, para facilitar a penetração e o micoparasitismo (Li et al., 2006, Mamarabadi et al., 2008), e outros metabólitos deletérios a microrganismos (Rodriguez et al., 2011). *Clonostachys rosea* controlou *Botrytis cinerea* em roseira, morangueiro e tomateiro, sob diferentes condições (Nobre et al., 2005, Morandi et al., 2001, Cota et al., 2008, Borges et al., 2015), bem como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe grisea*, *Verticillium dahliae* e *Fusarium culmorum* (Thines et al., 1997, Sutton et al., 1997, Rodriguez et al., 2011, Saraiva et al., 2014). Portanto, a eficiência de *C. rosea* é indiscutível, mas o que dizer de seu efeito no agroecossistema?

Como mencionado, conhece-se pouco acerca das interações do agente de biocontrole e microrganismos não alvos. Este conhecimento é, ainda, mais restrito quanto a *C. rosea*, e se obtiveram dois relatos conflitantes relacionados à aplicação do antagonista no solo: redução dos grupos de microrganismos da rizosfera de trigo, principalmente *Glomus intraradices*, fungo micorrízico (Ravnskov et al., 2006), e um aparente estímulo benéfico à atividade microbiana do solo (Johansen et al., 2005). Com o surgimento das novas técnicas de sequenciamento genético, o microbioma de plantas tem sido melhor compreendido, e de forma geral têm-se observado que o efeito da aplicação de agentes de controle biológico sobre populações de microrganismos residentes em plantas é transiente (Massart et al., 2015).

As interações foliares são menos conhecidas, pois o ambiente filosfera/filoplano é menos estudado que o da rizosfera (Massart et al., 2015, Saravanakumar et al., 2017), e tem-se buscado entender essas interações (Bulgarelli et al., 2013). As comunidades microbianas do filoplano são adaptadas a condições adversas, como poluição do ar, radiação ultravioleta e flutuações na temperatura e umidade relativa. Microrganismos do filoplano/filosfera podem ter relações tróficas aparentemente neutras com as plantas, mas acredita-se que o microbioma foliar desempenha várias funções, como absorver nutrientes, manter o crescimento de plantas sob estresse biótico e/ou abiótico e induzir resistência a fitopatógenos (Zhang et al., 2008, Massart et al., 2015), com papel final importante na sanidade das plantas (Perazzolli et al., 2014). Compreender as relações nos sistemas acb -microbioma-planta é importante para traçar estratégias de controle do patógeno (Massart et al., 2015) e mesmo para definir quanto ao uso ou não do acb.

Como mencionado, é provável que os mesmos mecanismos de antagonismo à microbiota fitopatogênica podem afetar a microbiota não alvo, e é crescente o número de estudos sobre a interação de *C. rosea* e o microbioma de plantas. Entretanto, as interações *C. rosea* e a microbiota de tomateiro são desconhecidas. Na Unidade de Controle Biológico, em ensaios preliminares, observou-se que amostras retiradas de tomateiros em que se aplicou *C. rosea* geraram poucas culturas de morfoespécies fúngicas nos dias que se seguiram à aplicação. Em amostras obtidas ao longo dos dias, houve redução de colônias do antagonista e aumento do número de morfoespécies fúngicas. Esses indícios, a escassez dos relatos sobre os efeitos de agentes de controle biológico sobre o microbioma e a importância do tema nortearam esse trabalho. Assim, objetivou-se investigar se a aplicação de *C. rosea* na parte aérea afeta o microbioma foliar do tomateiro.

Metodologia

Desenho experimental e amostragem

Os experimentos ocorreram na Unidade de Controle Biológico, casa de vegetação e Laboratório de Biologia de Populações de fitopatógenos do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Usou-se o isolado NCR61/F de *C. rosea* (Nobre et al., 2005), cultivado em arroz em sacos de polipropileno com filtro, a 25°C e 12h de fotoperíodo, sob luz fluorescente. Diariamente, revolveu-se o substrato para favorecer a colonização fúngica. Após 10 dias, adicionaram-se água destilada esterilizada (ADE) e Tween 80 (0,05% v/v), 250 mL/saco. Agitou-se a mistura, filtrou-se em camada dupla de gaze e ajustou-se a suspensão para 10^7 conídios.mL⁻¹, com auxílio de hemacitômetro.

Cultivaram-se tomateiros, grupo Santa Clara, em substrato contendo 3L de solo de terriço, 1L de esterco bovino curtido, 20.8g de Osmocote® e 10.4g de Yoorin®, em vasos de 4L, em casa de vegetação, a 25±2°C. No início do estágio reprodutivo (aos 50 dias do transplante), marcaram-se aleatoriamente folíolos de tamanho uniforme no terço médio-superior de cada planta, e aspergiu-se em toda superfície da planta, suspensão de conídios de *C. rosea* ou ADE. Após 30 min (dia 0) e 3, 6, 12, 24 e 48 dias da aplicação, de cada planta coletaram-se seis folíolos, que foram transferidos para 30 mL de tampão fosfato salino (PBS) em tubos tipo Falcon de 50mL, que foram vortexados (1 min) e sonificados (10 min). Retiraram-se os folíolos, e se centrifugou a suspensão de lavagem a 22000 x g a 4°C por 30 min. Descartou-se o sobrenadante, e a partir dos pellets formados, procedeu-se à extração de DNA.

Os folíolos foram lavados por duas vezes em hipoclorito de sódio 0,5% e ADE, secos em câmara de fluxo laminar e armazenados a -80°C. No momento do uso, foram seccionados em fragmentos de 4mm² e se transferiram 2g para 8mL de PBS em tubos tipo Falcon de 15mL, que foram mantidos horizontalmente, a 22°C, no escuro, sob agitação a 100rpm. Após 12h, filtrou-se em camada dupla gaze em novo tubo, centrifugou-se a 22000 x g a 4°C por 30 min, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à extração de DNA.

Extração de DNA

Para a extração, adotou-se o protocolo de Stevenson e Weimer (2007), com modificações. Em cada tubo com o pellet, adicionaram-se 400 µL tampão de extração (100mM de Tris/HCL, 10mM de EDTA e 0,15M de NaCl, pH 8,0). O pellet foi ressuspensionado, homogeneizado em vortex (1 min), e o conteúdo transferido para tubos plásticos de 2mL resfriados. A cada tubo, adicionaram-se 500mg de beads de zircônio/sílica de 0,1mm de diâmetro, 50µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e 500µL de fenol equilibrado. Agitaram-se os tubos em macerador (*Bead-Beater 24*) por 2 min, por duas vezes. Entre as agitações, mantiveram-se os tubos a 60°C por 10 min. Após, centrifugou-se a mistura a 14000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi pipetado e transferido para 500µL de clorofórmio resfriado em novo tubo. Agitaram-se os tubos por inversão durante 5 min e se centrifugou a 14000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi pipetado cuidadosamente e transferido para volume equivalente de isopropanol resfriado em novo tubo, que foi invertido por 1 min e mantido a -20°C durante 6 h. Centrifugou-se como anteriormente e lavou-se o pellet formado por duas vezes em etanol resfriado (70%); após cada lavagem, centrifugaram-se os tubos e se descartou o sobrenadante. Deixou-se secar por 30 min, para o etanol evaporar, e ressuspendeu-se cada pellet em 50 µL de Tris-EDTA 1x (TE) e 1,5µL de RNase. Os tubos foram mantidos a 37°C por 20 min e armazenados a 1°C. Após as extrações, quantificou-se o DNA e aferiu-se sua integridade, em gel de agarose 1%, corado com Gel RedTM. Após diluir o DNA de microrganismos epifíticos e endofíticos para 50 ng.µL⁻¹, estocou-se a -20°C.

Microbioma de tomateiros acessado por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

Para se avaliar as alterações nas comunidades microbianas após aplicar *C. rosea*, inicialmente, usou-se a estratégia da PCR-DGGE. Amplificaram-se os DNAs de fungos e bactérias epifíticos e endofíticos com marcadores universais. Para a comunidade

bacteriana, amplificou-se a região V3 do gene rRNA 16S (Muyzer et al., 1993) com iniciadores 341f-GC/518r (Muhling et al., 2008). Para a comunidade fúngica, amplificou-se a região ITS1 com iniciadores ITS1fGC/ITS2 (White et al., 1990).

As reações de PCR ocorreram em tubos de 200µL para o volume final de 25µL da solução de reagentes: 2,5 µL do Tampão GoTaq® Reaction Buffer (5X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM) 2,0 µL de dNTPs (2 mM), 0,3 µL de primer forward (10 µM), 0,3µL de primer reverse (10 µM), 0,5µL de GoTaq® DNA polimerase (5 un./µL), 2µL de BSA (2 mg/mL), 1,0 µL de DNA (20 ng/ µL), água ultrapura e DNA. Usou-se o termociclador Mastercycler® Nexus Eppendorf. Para amplificar sequências bacterianas, usou-se o protocolo de execução da PCR de Muhling et al. (2008), com modificações. Inicialmente, aqueceram-se as soluções a 96°C por 4 min, para desnaturação, e se realizaram 35 ciclos de amplificação. Em cada ciclo, as soluções foram mantidas sucessivamente a 96°C (1 min), 56°C (1 min) e 72°C (30 s). Após os ciclos de amplificação, mantiveram-se os tubos a 72°C por 5 min para a extensão final. Para a comunidade fúngica, executou-se a PCR segundo o protocolo de Liu et al. (2015). Em todas as reações, o controle negativo consistiu da solução com reagentes da PCR e água ultrapura ao invés de DNA molde. Os amplicons foram testados em gel de agarose 1,8%, corado com Gel Red™ Biotium e o peso molecular foi contrastado com marcador de DNA de 100pb.

Para a DGGE, prepararam-se géis verticais de poliacrilamida (acrilamida: N,N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) com gradiente desnaturante de ureia e formamida em tampão TAE 1x, no equipamento DGGE-2401 (C.B.S. Scientific Company, USA). Para os amplicons bacterianos, usou-se gel a 80g/l (8%) e gradiente desnaturante variando linearmente de 40% a 60%; para os amplicons fúngicos, usou-se gel a 60g/l e gradiente desnaturante de 35 a 55%.

Para preparar as soluções desnaturantes, misturaram-se soluções estoque de poliacrilamida: uma com 100% de agentes desnaturantes (uréia 7 M e formamida deionizada 400 mL/L) e uma sem ambos. A cada solução adicionaram-se 3,6 mL/L de persulfato de amônio (100 g/L) [polimerizador] e 0,43 mL/L de TEMED (N,N,N'',N''-tetrametiletileno diamino). Nas soluções a 55 e 60%, adicionaram-se 20 µL de corante (azul de bromofenol 5 g/L; xileno cianol 5 g/L e TAE 1X) para visualizar o gradiente. Para haver polimerização do gel, aguardaram-se 3h para aplicar as amostras.

Para cada comunidade, misturaram-se os produtos da PCR das repetições de cada tratamento e época de coleta e se obtiveram 12 amostras de microrganismos epifíticos e 12 de endofíticos. De cada amostra, misturaram-se 8 µL a 8 µL do tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5 g/L; xileno cianol 0,5 g/L; glicerol 70% e TAE 1 X).

Homogeneizou-se e aplicou-se a mistura a canaletas do gel de poliacrilamida. Como marcador, aplicado nas extremidades do gel, para bactérias, usou-se uma mistura de fragmentos de rRNA 16S de *Escherichia coli* ATCC 29214 (γ -Proteobacteria), *Salmonella enterica typhimurium* ATCC 14028 (γ - Proteobacteria), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Firmicutes) e *Lactococcus lactis* ATCC 19435 (Firmicutes); para fungos, usou-se uma mistura de fragmentos da região ITS1 de *Trichoderma harzianum*, *Pseudocercospora ulei*, *Geotrichum* sp. e *Mucor* sp.

A eletroforese ocorreu a 60°C e 90 V constante, durante 15h. Coraram-se os géis por 20 min com solução de SYBR® Gold (Invitrogen). As imagens foram visualizadas e foto-documentadas em sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene) e analisadas com o software BioNumerics® Maths, v.6.6. Geraram-se matrizes binárias de presença e ausência de bandas e, com o programa Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis (PAST), calcularam-se os índices de riqueza e de diversidade. Adicionalmente, realizou-se análise de agrupamento, e geraram-se dendogramas segundo o método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) com base na matriz binária de presença e ausência de bandas e no coeficiente de Dice de similaridade.

Microbioma de tomateiro acessado por DNA *metabarcoding*

Transferiram-se amostras de DNA de três repetições de cada tratamento, endofíticos e epifíticos para placas de PCR com 96 poços. Liofilizou-se o DNA, selou-se a placa e se enviaram as amostras ao Argonne National Laboratory (Illinois, USA) (<http://www.anl.gov/>), para sequenciamento. Usou-se a plataforma Illumina MiSeq® (Coporaso et al., 2012). Para amplificação, usaram-se marcadores para as regiões V4 do SSU rRNA 16S, com os primers 515F (5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') a 806R (5'- -GGACTACHVGGGTW-TCTAAT-3'), para bactérias (Coporaso et al., 2011), e a região ITS1 com primers ITS1F (5' -CTTGGCCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5' – GCTGCGTTC-TTCATCGATGC-3') para fungos (White et al., 1990).

Análise de dados

Analisaram-se os dados do sequenciamento com o Quantitative Insights Into Microbial Ecology Software (Qiime 1.9.1) (Coporaso et al., 2010), com os protocolos para sequências 16S e ITS do Brazilian Microbiome Project (BMP) disponível em: <http://brmicrobiome.org> (Pylro et al., 2014) para filtrar sequências com baixa qualidade, agrupar sequências com alta similaridade e efetuar análises de diversidade. Na etapa de

limpeza, descartaram-se sequências de tamanho menor que 140pb, qualidade inferior a 25 na escala de Phred e uma ou mais bases ambíguas. Com o auxílio do programa ITSx (Bengtsson-Palme et al. 2013), manteve-se apenas a região ITS1 de alta variabilidade. Agruparam-se as sequências fúngicas remanescentes em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) a 97% de identidade, usando-se o método Upsarse (Edgar 2013). Agrupou-se cada OTU em taxa específicas, por meio da ferramenta blast do Qiime. Para a anotação taxonômica de bactérias, usou-se o banco de dados do GreenGenes (DeSantis et al., 2006); para fungos, o banco UNITE (Koljalg et al. 2014). Adotou-se a estratégia de rarefação para igualar o número de sequências por amostras. A cobertura Good (Good, 1953) foi calculada e os valores sempre foram maiores que 0.9 para todas as amostras.

A partir das matrizes de OTUs, calcularam-se índice de diversidade de Simpson, de riqueza Chao1, equitabilidade e curvas de rarefação. Estimou-se a beta diversidade com base na matriz de distância pelo método de Unifrac, para bactérias, e pelo método de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957), para fungos. Efetuaram-se análises de coordenadas principais (PCoA), e gráficos de abundâncias com a ferramenta/pacote Phylloseq (MacMurdie & Holmes, 2013) e o programa R (Team 2012). Calcularam-se as abundâncias relativas de filos fúngicos e bacterianos, e estudou-se a dinâmica temporal das abundâncias dos gêneros fúngicos e bacterianos mais presentes em plantas tratadas com o antagonista em relação às testemunhas. Para as OTUs não classificadas com base nos bancos de dados do Unite (fungos) e do greengenes (bactérias), compararam-se as sequências com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio da ferramenta BLAST[®]. Para definir as sequências a se comparar, adotaram-se os critérios: menor e-value, maior bitscore, maior cobertura e maior identidade entre sequências.

Resultados

Microbiota de tomateiro acessado por eletroforese em gel com gradiente desnaturante

A diversidade e riqueza do microbioma alteraram-se nos primeiros dias após aplicação do antagonista. Assim, alterações ocorreram nas comunidades bacterianas endofíticas e epifíticas filoplano (Figura 8-A, B) e mais acentuadamente nas comunidades fúngicas epifíticas (Figura 8D) que nas endofíticas, nas quais menores valores de riqueza e diversidade ocorreram aos 6 dias após a aplicação (Figura 8C). Nas coletas posteriores, ocorreu efeito de recomposição, e microbioma de plantas tratadas tendeu ao equilíbrio, como nas não tratadas.

Pela análise dos dendrogramas, ocorreu baixa similaridade entre comunidades bacterianas de plantas tratadas ou não, que explicassem o comportamento da comunidade ao longo do tempo (Figura 9, A e B). Para as comunidades fúngicas, houve maior similaridade e separação das comunidades das plantas tratadas ou não com *C. rosea*, nos diferentes tempos avaliados (Figura 9, C e D).

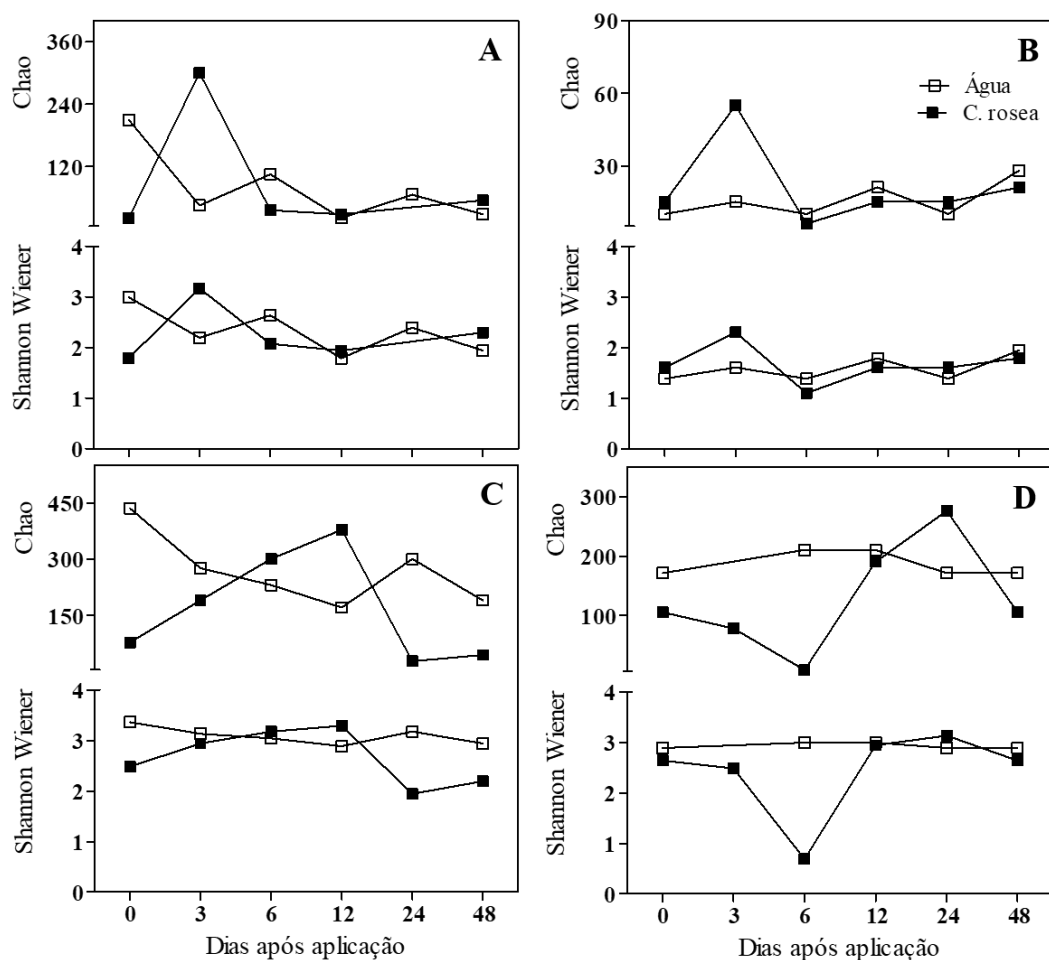


Figura 8: Índices de riqueza (Chao) e de diversidade (Shannon Wiener), gerados a partir da matriz de presença e ausência do perfil eletroforético de microbioma de tomates tratados com *Clonostachys rosea* ou água. A e B: Bactérias, endofíticas (A) e epifíticas (B). C e D: Fungos, endofíticos (C) e epifíticos (D).

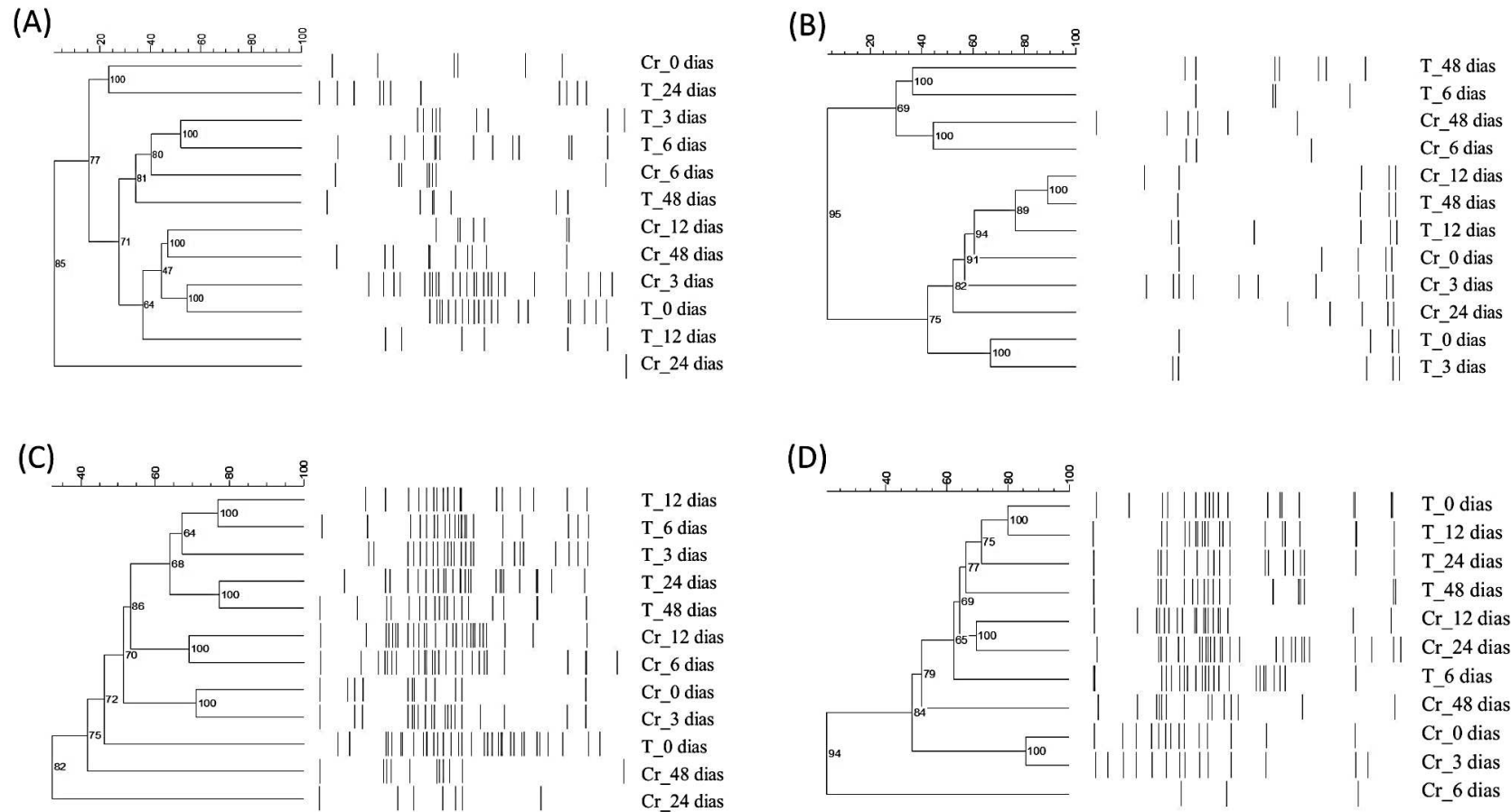


Figura 9: Dendogramas gerados a partir dos perfis eletroforéticos do microbioma de tomateiros em diferentes intervalos após aplicação de *Clonostachys rosea* (Cr) ou água (T). A e B: Sequências do gene rRNA 16S para bactérias endofíticas (A) e epifíticas (B). C e D: Sequências da região ITS para fungos endofíticos (C) e epifíticos (D). A escala associada aos dendogramas representa o índice Dice de similaridade (%) entre amostras ou grupos de amostras.

Microbioma de tomateiro acessado por DNA metabarcoding

Dados do sequenciamento

Após eliminar sequências de baixa qualidade, retirar quimeras e sequências indesejadas, como de cloroplastos e mitocôndrias, obtiveram-se totais variados de sequências (tabela 2). Visando minimizar os efeitos da cobertura do sequenciamento na análise de diversidade e comparação de taxa, aplicou-se o método de rarefação, e reduziu-se o total de sequências obtidas em cada amostra. As estimativas da diversidade alfa e beta foram baseadas em matrizes de OTU uniformemente rarefeitas.

Tabela 2: Números de sequências, antes e após a retirada de sequências de baixa qualidade, quimeras e sequências ambíguas, número de OTU's e cobertura do sequenciamento de amostras fúngicas e bacterianas, endofíticas e epifíticas do microbioma de tomateiro.

Grupo	Local	Número de sequências		Número de OTUs ¹	Coverage
		Total	Após limpeza		
Bacteria	Epifítico	296425	266165	1174	0.97
	Endofítico	761866	460770	79	0.99
Fungi	Epifítico	846384	205010	888	0.96
	Endofítico	761866	304040	484	0.99

¹OTU's obtidas pelo método Usearch, usando como ponto de corte o valor de 97%

Diversidade

A aplicação de *C. rosea* afetou a diversidade alfa de comunidades fúngicas e bacterianas, considerando-se os índices de riqueza Chao1 e Equitabilidade e diversidade Simpson (Figura 10). Até 12 dias da aplicação, a riqueza e a diversidade da comunidade fúngica epifítica de plantas tratadas com *C. rosea* foram menores que a de plantas tratadas apenas com água (Figura 10A). Na comunidade fúngica endofítica, esse efeito ocorreu aos 0 e 3 dias da aplicação do antagonista (Figura 10B). Durante o período avaliado, a riqueza e diversidade tenderam a reduzir nas comunidades endofíticas de plantas não tratadas com o antagonista

Na comunidade bacteriana epifítica, a diversidade e riqueza variaram, com valores menores valores de riqueza aos 3 dias da aplicação e menores valores de diversidade aos 3 e 12 dias da aplicação (Figura 10C). Na comunidade bacteriana endofítica, a diversidade em todas as épocas foi semelhante, em plantas, tratadas ou não com *C. rosea*, enquanto na comunidade epifítica, a diversidade e riqueza reduziram-se nas plantas tratadas ou não (Figura 10D).

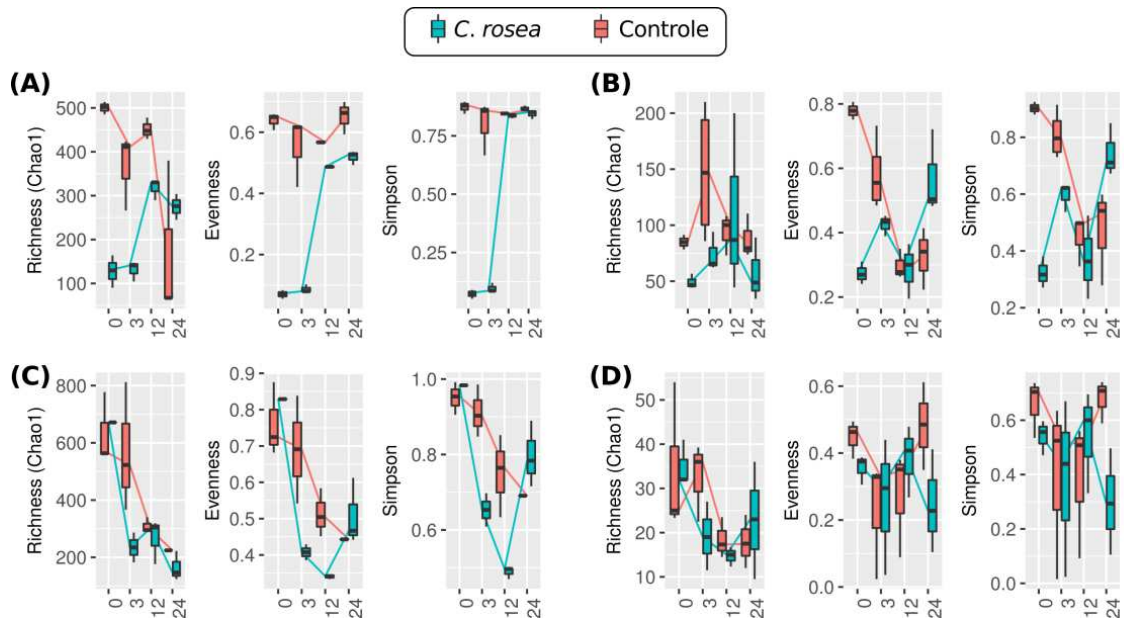


Figura 10: Índices de riqueza (Chao1), Equitabilidade (evenness) e de diversidade (Simpson) do microbioma de tomateiros em diferentes intervalos após aplicação de *Clonostachys rosea* (linha azul) ou água (linha vermelha). A e B: Fungos, epifíticos (A) e endofíticos (B). C e D: Bactérias, epifíticas (C) e endofíticas (D).

Pela análise de coordenadas principais (PCoA), houve grande variação nas comunidades fúngicas. Tanto a comunidade epifítica (Figura 11A) como a endofítica (Figura 11B), de plantas tratadas com *C. rosea*, diferiram da comunidade das não tratadas aos 0 e 3 dias de aplicação, com baixa diversidade. Nas coletas posteriores, a diversidade aumentou, a microbiota se recompôs, e a diversidade das comunidades de plantas tratadas ou não com *C. rosea* foram semelhantes nas coletas finais.

As comunidades bacterianas epifíticas de plantas tratadas com *C. rosea* diferiram das tratadas apenas com água, aos 3 dias da aplicação, e foram semelhantes nos demais períodos (Figura 11C). Houve pouca alteração nas comunidades bacterianas endofíticas, que foram semelhantes durante todo o período avaliado (Figura 11D).

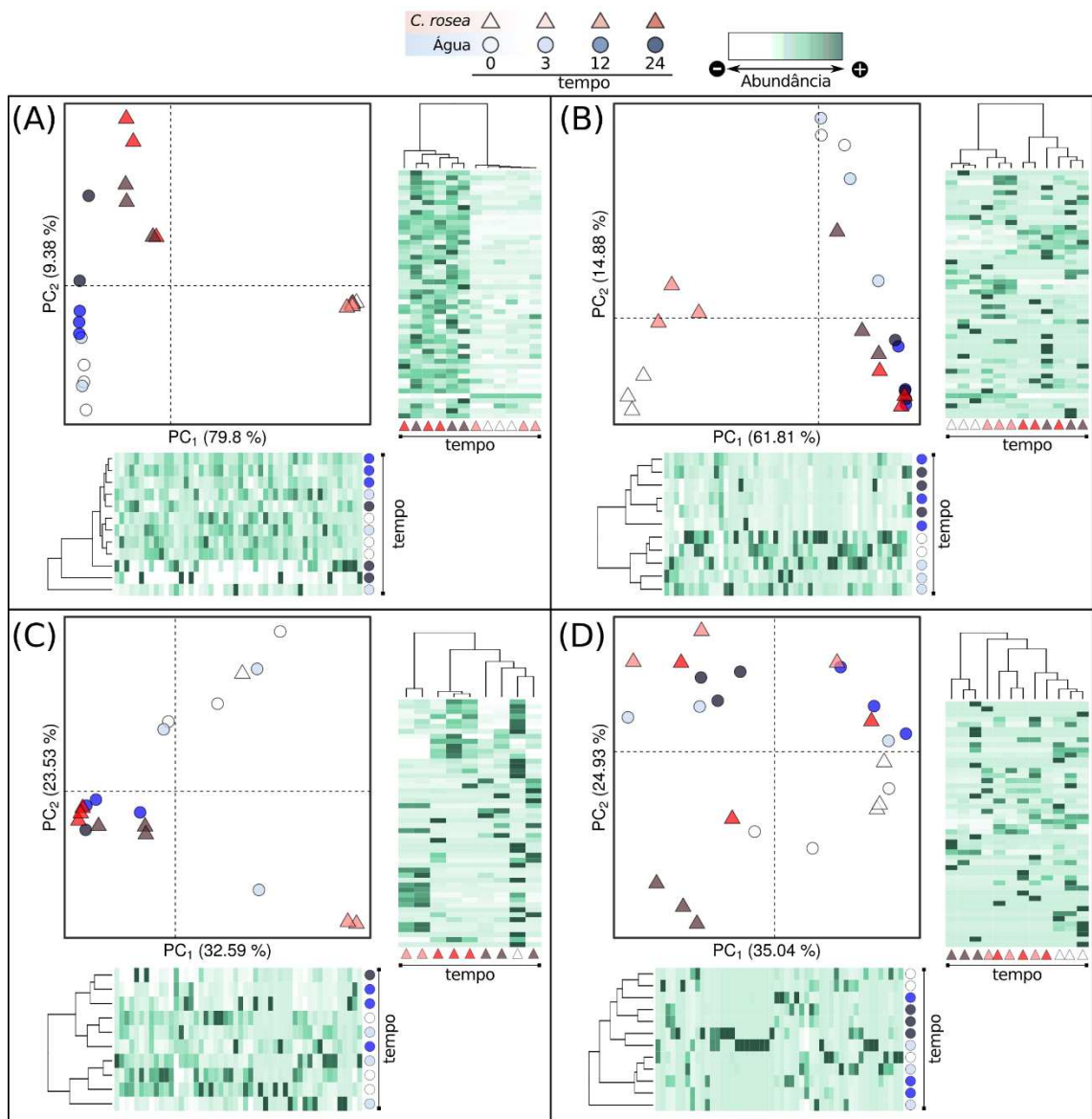


Figura 11: Coordenadas principais (PC), obtidas por meio da matriz de dissimilaridade, de microbioma de tomateiros em diferentes intervalos após aplicação de *Clonostachys rosea* (triângulos) ou água (círculos). A e B: Matriz de Bray-Curtis, para fungos epifíticos (A) e endofíticos (B). C e D: Método Unifrac, para bactérias epifíticas (C) e endofíticas (D). Heatmaps na vertical, apresentam agrupamentos de OTU's de plantas tratadas com o antagonista e na horizontal de plantas tratadas com água.

Abundância relativa

Os filos fúngicos Ascomycota e Basidiomycota foram os mais abundantes em folhas de tomateiro. Os ascomicota representaram mais de 50% da diversidade fúngica, enquanto os basidiomicota tiveram mais de 9%; dentre os mais representativos. Não se conseguiu alocar 40% das OTUs de fungos epifíticos e 39,5% das de endofíticos, segundo

o banco de dados do UNITE. Em ambos os locais da folha, percebeu-se alterações nas abundâncias relativas, dos filos fúngicos nos dias iniciais da aplicação (figura 12B, D).

Em bactérias do filoplano, predominaram os filos: proteobacteria (38,2%), firmicutes (8,6%), actinobacterias (7,4%), cianobactérias (3,6%) e bacterioidetes (1,7%). Endofiticamente, predominaram: proteobacteria (85,4%), firmicutes (13,1%), cianobactéria (1,1%) e bacterioidetes (0,2%). Apesar disso, na superfície foliar maior número de filos abundantes pôde ser observado. No interior das folhas de plantas tratadas com *C. rosea* houve menor abundâncias dos filos firmicutes e maior de proteobacteria, que foi predominante. (Figura 12A, C).

Para minimizar o número de microrganismos não classificados, sempre que necessário, compararam-se as sequências de OTUs com o banco de dados do NCBI, por meio da ferramenta BLAST, e identificaram-se os gêneros mais abundantes em cada caso. O gênero *Cladosporium* foi o mais abundante em folhas de tomateiro. No filoplano os gêneros mais abundantes foram *Alternaria*, *Catenulostroma*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Resinicium*, *Schizophyllum*. Destes, a grande maioria, sofreram redução em abundância, nas plantas tratadas com *Clonostachys rosea* nos dias iniciais a aplicação (Figura 13). Posteriormente, houve aumento da abundância de todos os gêneros, em plantas tratadas ou não com *C. rosea*. A abundância de alguns gêneros, como *Fusarium*, reduziu-se com o tempo, principalmente nas plantas não tratadas. Endofiticamente, os gêneros mais abundantes foram: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Cochiobolus*, *Exserohilum*, *Fusarium*, *Mycosphaerella* e *Nigrospora*. Semelhante à superfície foliar, a maioria dos gêneros foi menos abundantes em plantas tratadas com *Clonostachys rosea* principalmente nos dias iniciais após a aplicação. O gênero, *Clonostachys* foi muito abundante nas plantas onde se aplicou *C. rosea* NCR61F, mas também ocorreu naquelas não tratadas.

Considerando-se as bactérias, observou-se, maior número de gêneros com valores altos de abundância no filoplano, destacando-se *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Candidatus Portiera*, *Enterobacter*, *Janibacter*, *Methylobacterium*, *Planifilum*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas* como os mais abundantes (Figura 13). As abundâncias relativas dos gêneros citados variaram entre plantas tratadas ou não com *C. rosea*, mas houve a tendência de redução das abundâncias relativas em plantas tratadas com o antagonista nos dias iniciais. Destaque para o gênero *Bacillus* que teve a abundância menor pela aplicação de *C. rosea*. Endofiticamente, número menor de gêneros com alta abundância foi observado. Visualizaram-se poucas alterações nas abundâncias dos gêneros em plantas tratadas com *C. rosea* ou não. Similarmente a

superfície foliar, o gênero *Bacillus* teve menor abundância em plantas tratadas com o antagonista, já o gênero *Pseudomonas* teve sua abundância aumentada 3 dias após a aplicação de *C. rosea*.

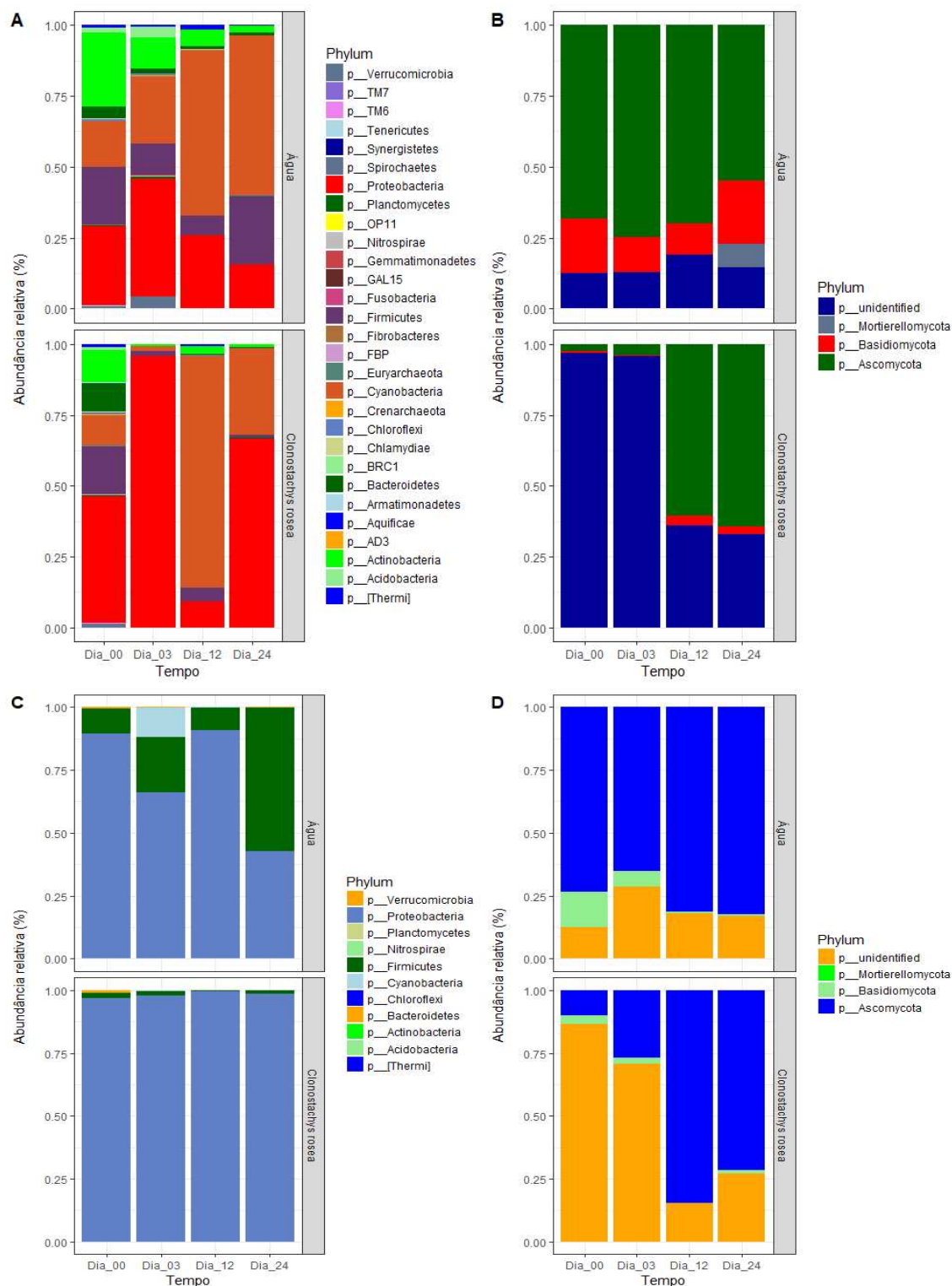


Figura 12: Abundâncias relativas de filos bacterianos epifíticos (A) e endofíticos (C); e fúngicos epifíticos (B) e endofíticos (D) de plantas de tomateiro, coletados aos 0, 3, 12 e 24 dias após a aplicação de água ou *Clonostachys rosea*

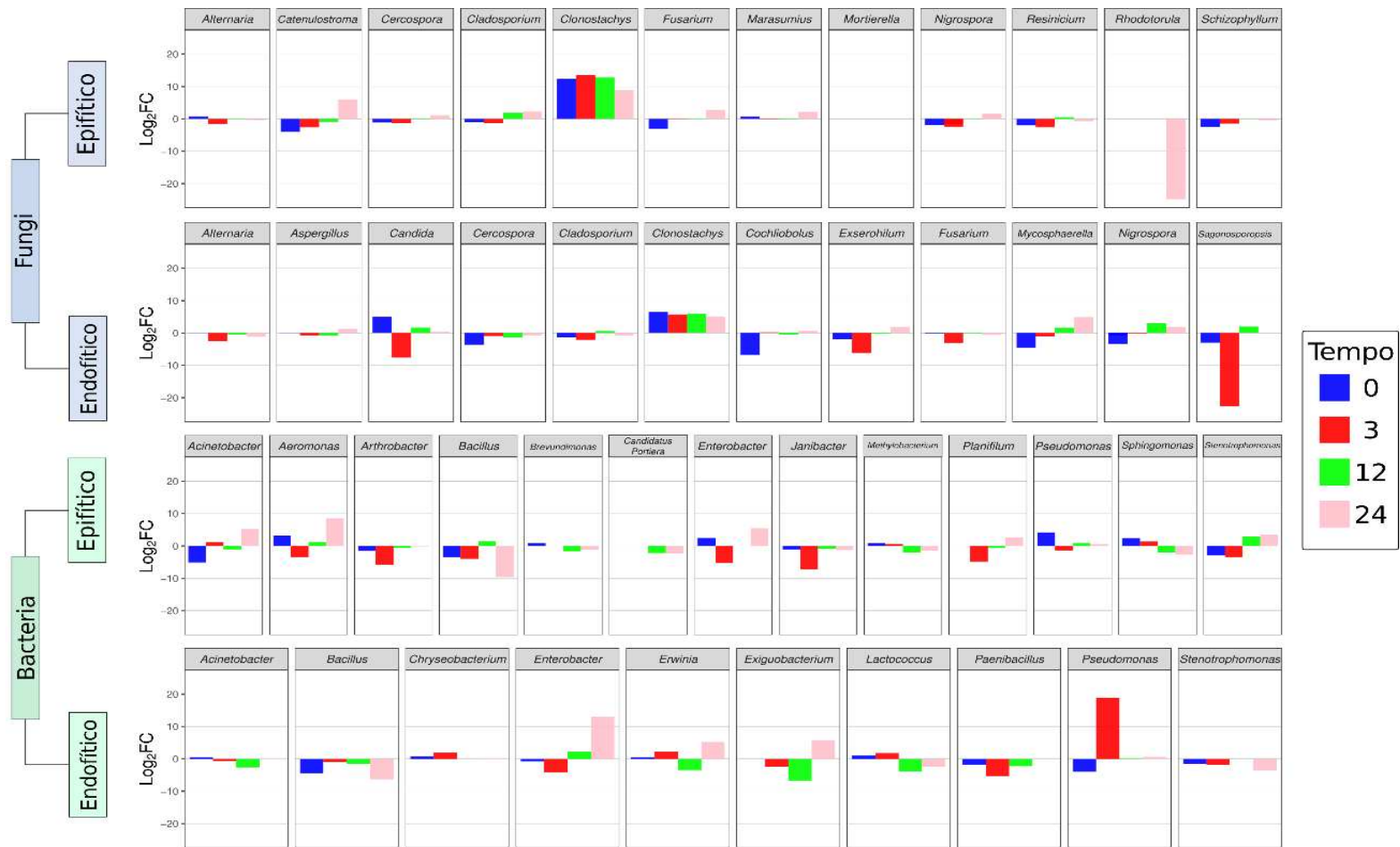


Figura 13: Abundância relativa de gêneros fúngicos e bacterianos, epifíticos e endofíticos em tomateiros aplicados com *Clonostachys rosea* em relação aos aplicados com água apenas. Valores positivos ou negativos representam maior ou menor abundância do gênero em relação ao controle (água) em diferentes dias após a inoculação

Discussão

O estudo do efeito da aplicação de acb é restrito às interações com fitopatógenos e plantas. Mas, já há estudos mostrando as relações de antagonistas com as comunidades não-alvo, principalmente na rizosfera (Massart et al., 2015). Entretanto, há poucas informações sobre o filoplano (Perazzoli et al., 2014). Embora, haja tendência crescente de investigações sobre o tema, não se encontraram publicações relacionadas quanto os efeitos de *C. rosea* na microbiota de tomateiro. No presente trabalho, elucidam-se aos efeitos da aplicação de *C. rosea* NCR61/F na microbiota foliar de tomateiros, por meio de duas abordagens: PCR-DGGE e sequenciamento de nova geração (NGS). Como tendência geral, a aplicação de *C. rosea* não alterou o padrão das comunidades bacterianas e fúngicas de folhas de tomateiro. A diversidade, uniformidade e composição reduziram-se inicialmente, mas houve efeito resiliente, com poucas diferenças nessas comunidades nas últimas coletas do estudo.

Adotou-se a PCR-DGGE, considerada eficaz para o estudo de perturbações em comunidades microbianas (Muyzer & Smalla, 1998). A técnica foi útil para comparar agrupamentos de plantas tratadas ou não com o antagonista. Detectaram-se alterações na diversidade e principalmente agrupamentos entre amostras do mesmo tratamento. A partir das análises de diversidade, percebeu-se haver maior perturbação nos dias iniciais após a aplicação, mas com respostas distintas quanto à riqueza e diversidade para comunidades de plantas tratadas ou não com *C. rosea*.

Com o sequenciamento das amostras de DNA, obteve-se grande número de sequências que foram agrupadas em OTUs. A partir das matrizes de rarefação, determinou-se a diversidade associada às comunidades bacterianas e fúngicas, epifíticas e endofíticas ao longo do tempo. Como já observado, os valores de riqueza e diversidade foram menores nos dias iniciais após aplicação de *C. rosea*. Houve maior alteração nas comunidades fúngicas que nas comunidades bacterianas do filoplano. *Clonostachys rosea* é reconhecidamente antagonista a fungos, mas não a bactérias. Entretanto, mesmo nas comunidades fúngicas, houve o efeito resiliente: com a dinâmica temporal e crescimento do tomateiro, a riqueza e a diversidade nas plantas tratadas foram se assemelhando às das não tratadas.

Com a análise de PCoA, avaliou-se a alteração na microbiota após a aplicação de *C. rosea*. As comunidades fúngicas epifíticas dos tomateiros tratados foram distintas daquelas de tomateiros não tratados nos três primeiros dias do tratamento. Seguiu-se o estreitamento das distâncias das comunidades de plantas tratadas ou não, com menores diferenças entre essas comunidades. Esses dados corroboram os de alfa diversidade e

pode-se depreender que, após a perturbação inicial, as comunidades microbianas foliares podem se recompor (Perazzoli et al., 2014; Massart et al., 2015). Considerando-se as comunidades bacterianas de plantas tratadas ou não, nas epifíticas ocorreram diferenças mais visíveis aos 3 dias da aplicação; as comunidades endofíticas de plantas tratadas às das não tratadas, em todas as épocas. Vários autores já observaram este efeito transitório na microbiota de plantas após a aplicação de acb (Scherwinski et al., 2007; Buddrus-Schiemann et al., 2010; Chen et al., 2013; Chowdhury et al., 2013; Yin et al., 2013, Perazzoli et al., 2014). Na maioria das constatações, a composição microbiana retornou ao estado similar ao de populações de plantas não tratadas (Massart et al., 2015). Mudanças nas populações podem ocorrer, com ou sem a presença dos antagonistas (Copeland et al., 2015), o que deve ser considerado em estudos futuros.

A redução da diversidade e riqueza de fungos epifíticos, até 3 dias da aplicação, provavelmente seja um artefato experimental: como *C. rosea* foi aplicado “massalmente (10^6 conídios/ mL de água) na superfície foliar, nas amostragens iniciais capturaram-se mais propágulos do antagonista do que da microbiota residente. Em vista do potencial competitivo (Sutton et al., 1997), há possibilidade de *C. rosea* ter competido com a microbiota e deslocado microrganismos, principalmente nos dias iniciais após aplicação. Vale mencionar que o isolado NCR61/F, aqui usado, pode produzir compostos tóxicos a *B. cinerea* (capítulo 1) e que, apesar de sobreviver no filoplano de tomateiros por até 48 dias, há redução abrupta na população do isolado já aos 3 dias pós-aplicação (capítulo 2). Assim, é provável que o efeito na microbiota até os 3 dias decorra da amostragem e da presença do antagonista e de compostos que produz. Com a passagem dos dias, a população de *C. rosea* diminui e os compostos que produz diluem-se no filoplano. Adicionalmente, o crescimento foliar também auxilia a “diluir” os efeitos do antagonista.

Como mencionado, a riqueza e a diversidade da comunidade bacteriana epifítica de plantas tratadas não se alteraram imediatamente após a aplicação do antagonista, e sim após 3 e 12 dias. As reduções na diversidade dessas comunidades podem estar associadas a metabólitos secundários produzidos por *C. rosea*, como peptaibols, glisopreninas e birssorbicilinoídes que têm ação antibiótica (Zhai et al., 2016). Novamente, vale mencionar que se isolaram compostos dessas famílias do caldo de cultivo do fungo (capítulo 1). Neste trabalho, cultivou-se o fungo em grãos de arroz durante 10 dias, preparou-se suspensão de conídios e se aplicou *C. rosea* nos tomateiros. É provável que metabólitos produzidos no substrato estivessem solúveis na suspensão de conídios e, após a aplicação, tenham sido tóxicos à população de bactérias sensíveis.

Em geral, a riqueza e diversidade de bactérias no filoplano diminuíram ao longo do período avaliado. A composição e a abundância de microrganismos na folha podem estar associadas a condições ambientais, sazonais (Copeland et al., 2015) e à idade dos tecidos foliares (Wagner et al., 2016). Conduziu-se o presente experimento em condições de casa de vegetação, e se espera que os efeitos sazonais e ambientais sejam desprezíveis. No início do experimento, no terço superior de tomateiros marcaram-se folíolos, os quais, ao final do experimento, eram mais velhos (até 48 dias) que os da primeira amostragem. Assim, é válido considerar que a idade dos tecidos tenha afetado as populações.

Em termos de abundância relativa de fungos, epifítica e endofiticamente, nas plantas tratadas, os Ascomycota foram os mais abundantes, com mais de 50% da abundância. A maioria de fungos epifíticos, inclusive *C. rosea*, é forma mitospórica de Ascomycetes, o que se refletiu na abundância. Nas plantas não tratadas, os Basidiomycota foram os mais abundantes, apesar dos valores baixos. Quanto à abundância relativa de bactérias, detectou-se predominância de proteobactérias. O microbioma foliar é diverso, e sua composição depende de vários fatores. Em estudo do microbioma epifítico de tomateiro, observaram-se composições diferentes de gêneros fúngicos e bacterianos em diferentes órgãos e regiões da planta (Ottenssen et al., 2013), e a abundância de filos bacterianos e fúngicos foram similares aos aqui obtidos.

A abundância dos gêneros fúngicos e bacterianos epifíticos foi menor em plantas tratadas, enquanto a abundância de gêneros endofíticos foi semelhante nas plantas tratadas ou não. A partir dessa observação, analisaram-se os gêneros fúngicos e bacterianos mais abundantes. Nas plantas tratadas, nos dias iniciais, a abundância de vários gêneros fúngicos, como *Cladosporium*, e de gêneros bacterianos reduziu-se principalmente no filoplano. Por outro lado, ocorreram poucas alterações entre plantas tratadas e não tratadas quanto à abundância dos organismos endofíticos. Esses resultados são importantes, quando se consideram microrganismos endofíticos benéficos, cujas populações, aparentemente, não foram reduzidas com a aplicação de *C. rosea*.

Tradicionalmente, os estudos relacionados ao controle biológico priorizam as interações antagonista-patógeno e antagonista-hospedeiro. Entretanto, há necessidade de entender as interações antagonista-microbiota, e há tendência crescente de publicações no tema. No Brasil, os estudos destas interações são raros. Assim, os resultados aqui obtidos são inéditos, principalmente considerando-se a interação *C. rosea*-microbiota de tomateiro. Como o ambiente foliar de tomateiro é diverso (Ottenssen et al., 2013) e sítio de infecções para vários patógenos, entender a dinâmica da microbiota local e os efeitos não-alvo da aplicação de antagonistas, será importante para avaliar estratégias do controle

biológico. O trabalho aqui também é importante porque lança mão de ferramentas moleculares para entender a dinâmica do microbiota foliar. Considerando o já discutido, a longo prazo uma aplicação de *C. rosea* não é deletéria à microbiota do tomateiro. Há necessidade de se avaliar se um programa de manejo que envolva maior número de aplicações também não o seja.

Referencias

- Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, Nilsson RH. 2013. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* 4:914–919.
- Borges ÁV, Saraiva RM, Maffia LA. 2015. Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 40:71-6
- Bray RJ, Curtis JT. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27:325–349.
- Brimner TA, Boland GJ, 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 100: 3-16.
- Buddrus-Schiemann K, Schmid M, Schreiner K, Welzl G, Hartmann A. 2010. Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. *Microbiol Ecology* 60: 381–393.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren Van Themaat E, Schulze-Lefert P, 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review Plant Biology* 64:807-38.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010) QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2011) NIH Public Access. 7:335–336.
- Chen F, Wang M, Zheng Y, Li S, Wang H, Han D, Guo S. 2013. The effect of biocontrol bacteria on rhizosphere bacterial communities analyzed by plating and pcr-dgge. *Current Microbiology*. 67: 177–182.
- Chowdhury SP, Dietel K, Randler M, Schmid M, Junge H, Borriss R, Hartmann A, Grosch R. 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS One* 8, e68818.

- Copeland JK, Yuan L, Layeghifard M, Wang PW, Guttman DS. 2015. Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:274-85.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF. 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46:515-22
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu F, Andersen GL. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5069–5072.
- Edgar RC. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10:996
- Good IJ. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40:237–264.
- Johansen A, Knudsen IMB, Binnerup SJ, et al., 2005. Non-target effects of the microbial control agents *Pseudomonas fluorescens* DR54 and *Clonostachys rosea* IK726 in soils cropped with barley followed by sugar beet: a greenhouse assessment. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 2225-39.
- Koljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M (2014) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22:5271–5277.
- Li J, Yang J, Huang X, Zhang K-Q. 2006. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry* 41:925-9
- Liu J, Yu Y, Cai, Z, Bartlan M, Wang Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGG. *World Journal Microbiology Biotechnology* 31: 1387.
- Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):8228–8235.
- Mamarabadi M, Jensen B, Jensen DF, Lübeck M. 2008. Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. *FEMS Microbiology Letters* 285:101-10

- Massart S, Martinez-Medina M, Jijakli MH, 2015. Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biological Control* 89: 98-108.
- McMurdie & Holmes (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*. 8(4):e61217.
- Morandi MaB, Maffia LA, Sutton JC, 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29: 103-13.
- Muhling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, Joint I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal* 2: 379–392.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Muyzer G. & Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34:132-43
- Ottesen AR, González Peña A, White JR, Pettengill JB, Li C, et al. 2013. Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology* 13:114.
- Pal KK & B. McSpadden Gardener, 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Perazzolli M, Antonielli L, Storari M, et al., 2014. Resilience of the Natural Phyllosphere Microbiota of the Grapevine to Chemical and Biological Pesticides. *Applied Environmental Microbiology* 80:3585-96.
- Pylro VS, Roesch LF, Ortega JM, Do Amaral AM, Tótola MR, Hirsch PR, Rosado AS, Góes-Neto A, Da Silva AL, Rosa CA, Morais DK, Andreote FD, Duarte GF, De Melo IS, Seldin L, Lambais MR, Hungria M, Peixoto RS, Kruger RH, Tsai SM, Azevedo V. 2014. Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity—challenges and prospects. *Microbial Ecology* 67:237–241.
- Ravnskov S, Jensen B, Knudsen IMB, et al., 2006. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results

- in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3453-62.
- Rodríguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110:1177-86
- Saraiva RM, Borges AV, Macedo PEF, Maffia LA. 2014. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole. *Revista de Ciências Agrícolas* 31: 78 – 91.
- Saravanakumar K, Li Y, Yu C, et al. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of Fusarium Stalk rot. *Scientific Reports*. 2017;7:1771..
- Scherwinski K, Wolf A, Berg G. 2007. Assessing the risk of biological control agents on the indigenous microbial communities: *Serratia plymuthica* HRO-C48 and *Streptomyces* sp. HRO-71 as model bacteria. *Biocontrol* 52: 87–112.
- Smith DP & Peay KG. 2014. Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing. *PLoS ONE* 9, e90234–e90234.
- Stevenson DM, & Weimer PJ. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied. Microbiology. Biotechnology* 75: 165–174.
- Sutton JC, Li D-W, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM. 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81:316-28.
- Team RDC. 2012. R: A language and environment for statistical computing. doi: ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Thines E, Eilberta F, Sternerb O, Ankea H. 1997. Glisoprenin A, an inhibitor of the signal transduction pathway leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea* on hydrophobic surfaces. *FEMS Microbiology Letters* 151: 219-224.
- Wagner MR, Lundberg DS, del Rio TG, Tringe SG, Dangl JL, Mitchell-Olds T. 2016. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications* 7:12151
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-22.

- Winding A, Binnerup SJ, Pritchard H, 2004. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 129-41.
- Yin D, Wang N, Xia F, Li Q, Wang W. 2013. Impact of biocontrol agents *Pseudomonas fluorescens* 2P24 and CPF10 on the bacterial community in the cucumber rhizosphere. *European Journal of Soil Biology* 59:36–42.
- Zhai MM, Qi FM, Li J, Jiang CX, Hou Y, Shi YP, Di DL, Zhang JW, Wu QX. 2016. Isolation of secondary metabolites from the soil-derived fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 2298–2306.
- Zhang B, Bai Z, Hoefel D, et al., 2008. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. *FEMS Microbiology Letter* 284: 102-8.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Metabólitos produzidos em cultivo por *Clonostachys rosea*, tiveram atividade supressiva a *Botrytis cinerea*. Maior eficiência em reduzir o crescimento de *B. cinerea* e na produção de diferentes metabólitos foram obtidos com maior tempo de incubação do antagonista. Destacam-se a grande produção de glisopreninas e bissorbicilinoídes, metabólitos comumente produzidos por outros isolados de *C. rosea*, e que são supressivos a patógenos. Os próximos trabalhos poderão revelar quais dos metabólitos, são isoladamente os mais supressivos ao patógeno.

A dinâmica temporal da sobrevivência do antagonista em plantas de tomateiro, pôde também ser melhor compreendida. O antagonista sobreviveu no filoplano, rizoplano e rizosfera do tomateiro durante 48 dias; a sobrevivência decresceu no filoplano e rizoplano, mas curiosamente manteve-se estável na rizosfera. A sobrevivência do antagonista pode impactar diretamente o controle da doença, e é conhecimento importante para determinar intervalos de aplicação.

A aplicação de *Clonostachys rosea* alterou o microbioma foliar de tomateiro, de forma transiente. Grupos fúngicos foram mais alterados pela aplicação do antagonista que bacterianos. Como visto, existe a redução no número de propágulos viáveis de *C. rosea* ao longo do tempo na superfície foliar e a recomposição do microbioma pode estar relacionado a menor presença do antagonista. Esses resultados sugerem que as alterações no microbioma de plantas de tomateiro, ocasionadas pela aplicação de *C. rosea*, são mínimas, e a microbiota consegue restabelecer-se ao longo do tempo. A interação de *C. rosea* e grupos específicos de fungos e bactérias, poderão ser melhor exploradas futuramente, e também o papel dos metabólitos nessas interações. Ademais, o conhecimento gerado é relevante e inédito quando se trata de microbioma de tomateiro sobre influência de agentes de controle biológico.