

# Estudo da capacidade entomopatogénica de fungos fitopatogénicos

Ana Marques<sup>1</sup>, Lúdia Dionísio <sup>1,2</sup>, Francisco Pallero-Bueno<sup>1</sup>, Luís Neto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Algarve, FCT, Campus de Gambelas, 8005-114 Faro, Portugal

<sup>2</sup> MeditBio, Centre for Mediterranean Bioresources and Food, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas – Edifício 8, 8005-139 Faro, Portugal, ldionis@ualg.pt

## Resumo

Os organismos estabelecem entre si múltiplas interações ecológicas que contribuem para a diversidade dos seus papéis nos ecossistemas. Assim, hoje em dia sabe-se que alguns fungos, para além das ações negativas que desempenham como agentes patogénicos de plantas, podem igualmente ter outras funções como ser endófitos em plantas, antagonistas de outros organismos fitopatogénicos ou realizar uma simbiose benéfica com a rizosfera. A capacidade de alguns fungos fitopatogénicos parasitarem artrópodes é um aspeto pouco estudado, mas que poderá ser uma via a explorar no combate a pragas, nomeadamente em situações em que a planta mostra algum grau de resistência a esse fungo. Neste trabalho testou-se a capacidade entomopatogénica dos fungos fitopatogénicos *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp. Os ensaios foram realizados a 25°C e 30°C, utilizando-se como inseto modelo *Galleria mellonella*. Os fungos testados cresceram em meio PDA à temperatura de 25°C. A inoculação dos fungos em *G. mellonella* foi feita através das técnicas de imersão e injeção. Os resultados obtidos mostraram que, em ambas as temperaturas e métodos de infeção, os fungos *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. têm capacidade entomopatogénica, enquanto que *Alternaria* spp. não mostrou essa capacidade em nenhuma temperatura ou método de infeção. Estes resultados sugerem que a presença de alguns fungos fitopatogénicos nos agrossistemas poderá ter aspetos positivos e que a sua multifuncionalidade deveria ser mais bem esclarecida e tida em conta no estabelecimento de programas de controlo biológico de pragas agrícolas.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, multifuncionalidade, controlo biológico

## Abstract

### Study of the entomopathogenic ability of phytopathogenic fungi

Organisms establish multiple ecological interactions that contribute to the diversity of their roles in ecosystems. Thus, it is currently known that certain fungi, in addition to the negative actions they perform as plant pathogens, may also have other functions such as being endophytes in plants, antagonists of other phytopathogenic organisms or perform beneficial symbioses with the rhizosphere. The capability of some arthropods to parasitize phytopathogenic fungi is an aspect that is not yet well studied, but may be a way to explore in combating pests, in situations where the plant shows some degree of resistance to the fungus. In this study, the entomopathogenic capability of the phytopathogenic fungi *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp. was tested. Assays were performed at 25°C and 30°C, using *Galleria mellonella* as an insect model. The tested fungi were grown on PDA and incubated at 25°C. Inoculation of the fungus in *G. mellonella* was done by immersion and injection techniques. The obtained results showed that, for both temperatures and infection methods, *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. have entomopathogenic capacity, while *Alternaria* spp. did not show this ability at any temperature or infection method. These results suggest that the presence of some phytopathogenic fungi in agrosystems may have positive aspects and their multifunctionality should be further clarified and taken into account in establishing the biological control of agricultural pest programs.

**Keywords:** *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, multifunctionality, biological control

## Introdução

As pragas de insetos são uma das principais causas de redução do rendimento das culturas agrícolas e de outros produtos alimentares, com consequências económicas importantes. A luta química é o método mais utilizado no controlo das pragas, no entanto os efeitos nocivos sobre o meio ambiente, os potenciais riscos para a saúde humana e o aparecimento de espécies resistentes a estes químicos, levaram ao desenvolvimento de estratégias alternativas com base biológica, para combater

pragas indesejáveis (Ali et al., 2015). Os agentes entomopatogénicos mais utilizados como bioinsecticidas são: vírus, bactérias, fungos e nematodes.

Os fungos entomopatogénicos colonizam uma grande variedade de ecossistemas, porém as condições ambientais têm um enorme impacto sobre o seu crescimento, sendo a humidade a variável mais importante. São vários os mecanismos e modos de ação que os fungos filamentosos, com capacidade patogénica, utilizam para infetar o hospedeiro. A infeção do agente patogénico no inseto pode ocorrer por contato direto entre cadáveres infetados com células fúngicas e hospedeiros suscetíveis, ou indiretamente através de esporos existentes na vegetação e no solo (Boomsma et al., 2013). Para dar início à infeção, é necessário que os conídios adiram à cutícula do inseto e germinem assim que estiverem reunidas as condições adequadas, tais como temperatura e humidade favoráveis e uma fonte exógena de carbono. Certos fungos como *Beauveria bassiana* possuem conídios com revestimento hidrofóbico, o que aumenta a adesão à superfície do inseto.

As hifas resultantes da germinação dos conídios formam apressórios que, através da pressão mecânica e libertação de enzimas que degradam a cutícula facilitam a entrada no hospedeiro (Fang et al., 2012). No inseto, as hifas desenvolvem-se absorvendo nutrientes e libertando toxinas. Estas substâncias segregadas pelos fungos podem provocar a morte do inseto (Valero-Jiménez et al., 2015). Por exemplo, quando atinge a hemolinfa do inseto, *B. bassiana* liberta substâncias, tais como bassicridina, bassianolido e beauvericina (Ortiz-Urquiza et al., 2010). Este fungo cosmopolita tem sido amplamente utilizado no controlo biológico, devido à sua vasta gama de hospedeiros, incluindo lépidópteros e ortópteros (Fuguet et al., 2004) e ao facto dos seus esporos serem relativamente fáceis de se obter em larga escala com custos reduzidos. É comercializado em forma de bioinsecticida em diversos países do mundo (Fan et al., 2011). No entanto, para os fungos serem utilizados em controlo biológico deve-se ter em conta alguns fatores importantes: o nível de virulência, a eficiência de produção e o grau de segurança que proporcionam aos mamíferos e a outras espécies que não se pretende atingir (Hussain et al., 2014).

Alguns géneros de fungos contêm espécies que são entomopatogénicas e outras que são fitopatogénicas, como por exemplo os géneros *Aspergillus* e *Alternaria*. Esta aptidão para hospedeiros de diferentes filos está na maior parte das vezes relacionada com espécies diferentes dentro do mesmo género, mas já foi observada ao nível de uma espécie ou mesmo para um isolado em particular (St Leger et al., 2000). É, desta forma importante, conhecer as diferentes funções dos fungos no ecossistema de maneira a identificar aqueles que poderão influenciar positivamente ou negativamente o controlo biológico das pragas (Vega et al., 2009).

*Aspergillus* spp., para além de ser um agente causador de doenças humanas, também é considerado um fungo patogénico para plantas e insetos (Tripathi et al., 2011). Este fungo é conhecido por segregar aflatoxinas, que são micotoxinas produzidas como metabolitos secundários (Hamid et al., 1987). Por outro lado este fungo causa decréscimos consideráveis na percentagem de germinação de sementes que infeta, nomeadamente de algumas gramíneas (Agrios, 1977).

Diversas espécies de *Alternaria* produzem doenças em plantas afetando principalmente a folha, caule, flores e frutos de hortícolas, ornamentais, citrinos e maçãs entre outros. Segundo Wang e colaboradores (2015) são consideradas os maiores agentes patogénicos de plantas, sendo responsáveis pela deterioração de muitas culturas agrícolas.

Fungos do género *Fusarium* causam doenças em várias culturas hortícolas, plantas florestais e ornamentais. Este fungo produz perdas económicas importantes em culturas de tomate, banana, algodão, tabaco e café (Agrios, 1977). Algumas das espécies, como *F. oxysporum* são patogénicas de humanos, insetos e plantas (Bitas et al., 2015).

Considerando a importância fitopatogénica dos fungos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Alternaria* spp., o objetivo deste trabalho foi avaliar a sua capacidade entomopatogénica, utilizando como inseto modelo *Galleria mellonella*. O lepidóptero *G. mellonella* apresenta características vantajosas para o estudo de infeções fúngicas em relação a outros hospedeiros invertebrados, tais como facilidade de criação em laboratório e metodologias de inoculação bem estabelecidas que, pela sua simplicidade, não requerem um treino técnico prolongado (Mylonakis, 2008).

## Materiais e métodos

Para testar a capacidade entomopatogénica dos fungos filamentosos *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp., foram utilizadas larvas de *G. mellonella* na última fase do estágio larval, com peso superior a 0,275 g, criadas no escuro sob condições de temperatura controladas (30±1°C). Os fungos testados foram isolados do solo utilizando *G. mellonella* como inseto armadilha, seguindo a metodologia descrita por Zimmermann (1986).

As larvas foram inoculadas por duas técnicas distintas (injeção e imersão), com suspensões com uma concentração de  $10^7$  esporos/ml em PBS e 0,05% de Tween 20. Procedeu-se também à inoculação de larvas unicamente com PBS e 0,05% de Tween 20 (controlo negativo) e com uma suspensão de  $10^7$  esporos/ml do fungo entomopatogénico *B. bassiana* em PBS e 0,05% de Tween 20 (controlo positivo). Em cada modalidade foram utilizadas 18 larvas e efetuadas três repetições. A técnica de imersão é um dos protocolos correntemente utilizados em testes de entomopatogenicidade com fungos (Hajek et al., 2012) e permite avaliar a capacidade de um fungo penetrar a cutícula do inseto e desenvolver-se no seu interior. A técnica de injeção tem sido recentemente utilizada para testar a possibilidade de *G. mellonella* ser utilizada como modelo de infeção por vários microrganismos (Mylonakis, 2008). Por ser uma técnica que envolve a preparação de uma menor quantidade de inóculo e que não necessita manter os insetos em condições adequadas de humidade, no caso de existir uma boa correlação entre os dois métodos, poderá ser uma metodologia interessante para testar rapidamente a resposta do inseto a estirpes com diferentes graus de virulência. Como o desenvolvimento tanto do agente patogénico como do inseto podem ser afetados pela temperatura, para ambas metodologias, após inoculação as larvas foram incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

O processo de injeção foi realizado com auxílio de uma seringa de 50  $\mu\text{l}$  (SGE, modelo 50F-GT), inoculando-se 10  $\mu\text{l}$  da suspensão de esporos na primeira pseudopata da larva. As larvas foram posteriormente colocadas em caixas de Petri em temperatura controlada.

Pelo método de imersão, cada larva foi imersa, durante 5 segundos, na suspensão de esporos. Após imersão, o excesso de líquido foi retirado colocando as larvas sobre papel absorvente estéril. As larvas foram colocadas em caixas de Petri durante 3 dias em câmara húmida e posteriormente retiradas. Todo o processo decorreu para ambas temperaturas.

Foram feitas observações diárias para registo da mortalidade das larvas e variações na coloração da cutícula. Os resultados foram analisados através de curvas de sobrevivência obtidas através da aplicação do método de Kaplan Meier do programa SPSS, versão 22. As curvas de sobrevivência das larvas infetadas pelos fungos em estudo foram comparadas com as curvas de sobrevivência do controlo positivo e negativo, em ambas as temperaturas e pelos dois métodos.

## Resultados e discussão

As larvas inoculadas com o fungo *Aspergillus* spp. apresentaram uma elevada taxa de mortalidade ao fim de 306 h (fig. 1), com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo (PBS), qualquer que seja o método de infeção ou temperatura de incubação. Comparando com a mortalidade provocada por *B. bassiana* (controlo positivo), verificou-se que existem diferenças que estão relacionadas com a temperatura de incubação. Enquanto a  $30^\circ\text{C}$  (fig. 1A e 1C) a mortalidade provocada por *Aspergillus* spp. foi estatisticamente semelhante à provocada por *B. bassiana*, a  $25^\circ\text{C}$  (fig. 1B e 1D) existem diferenças significativas entre as curvas de sobrevivência. Assim, através do método de imersão a  $25^\circ\text{C}$  (fig. 1B), durante o período de observação, a mortalidade provocada por *Aspergillus* spp. foi inferior à provocada por *B. bassiana* e em geral os efeitos foram mais demorados. Através do método de injeção a  $25^\circ\text{C}$  (fig. 1D), embora a mortalidade final seja igual para os dois fungos, os efeitos foram mais demorados em *Aspergillus* spp. Estes resultados demonstram que o isolado de *Aspergillus* spp. avaliado tem a capacidade de penetrar a cutícula da larva, provocando a sua morte, podendo ser considerado um fungo entomopatogénico. No entanto a sua virulência depende da temperatura.

As larvas inoculadas com o fungo *Fusarium* spp. apresentaram uma elevada taxa de mortalidade (fig. 2) com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo (PBS), qualquer que seja o método de infeção ou temperatura de incubação. Para este fungo, as diferenças em relação a *B. bassiana* (controlo positivo) estão relacionadas principalmente com o método de inoculação. As larvas inoculadas por imersão com *Fusarium* spp. (fig. 2A e 2B) apresentaram uma mortalidade inferior e com efeitos mais demorados quando comparados com *B. bassiana*, sendo que esta diferença parece ser maior à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Pelo contrário através da inoculação por injeção (fig. 2C e 2D), não existem diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo positivo. Estes resultados permitem concluir que o isolado de *Fusarium* sp. tem a capacidade de penetrar a cutícula das larvas provocando a sua morte, podendo desta forma também ser considerado entomopatogénico.

Com *Alternaria* spp. não foi realizado o método de injeção a  $25^\circ\text{C}$ . Através da figura 3, conclui-se que não houve diferenças significativas entre a sobrevivência das larvas inoculadas com *Alternaria* spp. e as larvas do controlo negativo (PBS) para os dois métodos de inoculação a  $30^\circ\text{C}$  e para as duas temperaturas através da inoculação por imersão. Desta forma, nas condições experimentais, *Alternaria* spp. não apresentou capacidade de penetrar a cutícula do inseto e mesmo

quando o inóculo foi introduzido no hemocelo do inseto (método de injeção), este consegue reprimir a infecção, pelo menos a 30°C. Desta forma, este isolado de *Alternaria* spp. não pode ser considerado entomopatogénico nestas condições.

Os resultados obtidos permitem concluir que os fungos *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. avaliados têm capacidade entomopatogénica a 25°C e 30°C, dado que em ambas as técnicas de inoculação utilizadas, a mortalidade registada foi relevante. No entanto, a eficácia da sua ação entomopatogénica poderá depender da temperatura. Estes dois géneros têm espécies que são agentes patogénicos de plantas, animais e humanos (Teetor-Barsch & Roberts, 1983; St Leger et al., 2000). Embora, em geral, exista alguma especialização em termos de hospedeiros, algumas espécies ou isolados têm mostrado ser capazes de colonizar hospedeiros bastante diferentes. Esta capacidade já tinha sido demonstrada para *Aspergillus flavus* por St Leger et al. (2000), utilizando apenas o método de injeção, o qual não será suficiente para sugerir que a mesma capacidade possa ocorrer em condições naturais. Os resultados obtidos, utilizando ambos os métodos sugerem que os isolados, por nós estudados, têm a capacidade de infetar hospedeiros muito diferentes. Esta multifuncionalidade de papéis nos ecossistemas faz com que estes fungos, embora possam provocar doenças em plantas, possam igualmente desempenhar um papel importante no controlo das populações de insetos. Desta forma, principalmente quando as plantas revelem algum grau de resistência a estes fungos, a sua ação como agentes de controlo biológico de pragas deverá ser tida em conta.

## Referências

- Agrios, G.N. 1997. Plant diseases caused by fungi. In: Plant pathology (4th edition). Academic Press. San Diego, California, USA.
- Ali, P.M., Kato, T. & Park, Y.E. 2015. Improved insecticidal activity of a recombinant baculovirus expressing spider venom cyto-insectotoxin. *Applied Microbiology Biotechnology* 99:10261-10269.
- Bitas V. et al. 2015. *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12(2):2164-2183.
- Boomsma, J.J., Jensen, B.A., Meyling, V.N. & Eilenberg, J. 2013. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology* 59:467-485.
- Fan, Y., Zhang S., Kruer, N. & Keyhani, O.N. 2011. High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 106:274-279.
- Fang, W., Azimzadeh P. & Leger, St. J.R. 2012. Strain improvement of fungal insecticides for controlling insect pests and vector-borne diseases. *Current Opinion in Microbiology* 15:232-238.
- Fuguet, R., Théraud M. & Vey, A. 2004. Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase like protein secreted by a melanizing isolate. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 138:149-161.
- Hajek, A.E., Papierok, B., & Eilenberg, A.J. 2012. Methods for study of the Entomophthorales. P. 285-316. In L.A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Academic press, London.
- Hamid, B.A. & Smith, E.J. 1987. Degradation of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Journal of General Microbiology* 133:2023-2029.
- Hussein, A., Rizwan-ul-Haq, Al-Ayedh, H. & Al-Jabr, M.A. 2014 Mycoinsecticides: potencial and future perspective. *Nutrition & Agriculture* 6:45-53.
- Mylonakis, E. 2008. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* 165:1-3.
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C. & Quesada-Moraga, E. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105:270-278.
- St Leger, R.J., Screen, S.E. & Shams-Pirzadeh, B. 2000. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* 66:320-324.
- Teetor-Barsch, G.H. & Roberts, W.D. 1983. *Fusarium* Species Pathogens of insects. *Mycopathologia* 84:3-16.
- Tripathi, R.V., Kumar, S. & Garg K. 2011. A study on trypsin, *Aspergillus flavus* and *Bacillus* sp. protease inhibitory activity in *Cassia tora* (L.) syn *Senna tora* (L.) Roxb. Seed extract. *Complementary & Alternative Medicine* 11(56).
- Valero-Jiménez, A.C., Wiegers, H., Zwaan, J.B., Koenraadt, J.M., & Kan, V.L. 2015. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 133:41-49.
- Vega, E.F. et al. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2:149-159.

Wang, J., et al. 2015. Identification and bioactivity of compounds from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* spp. Mar. Drugs 13 (7):4492-4504.

Zimmermann, G. 1986. The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. Journal of Applied Entomology 102:213-215.

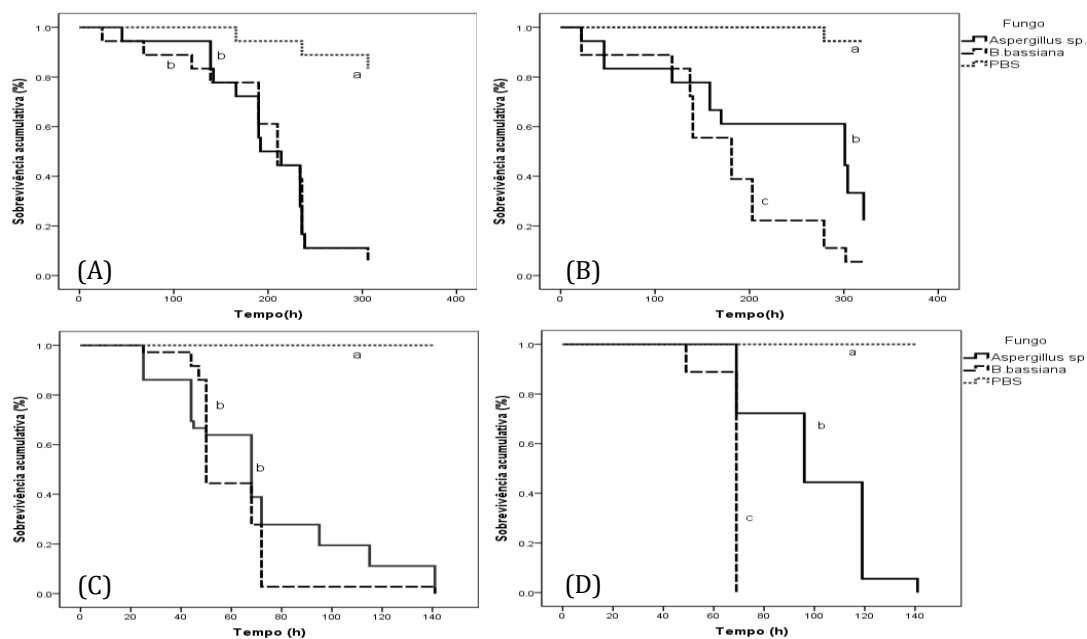


Figura 1 – Curvas de sobrevivência das larvas infetadas pelo fungo *Aspergillus* spp. e respectivos controlos (A) Método de imersão a 30°C. (B) Método de imersão a 25°C. (C) Método de injeção a 30°C. (D) Método de injeção a 25°C. As curvas identificadas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

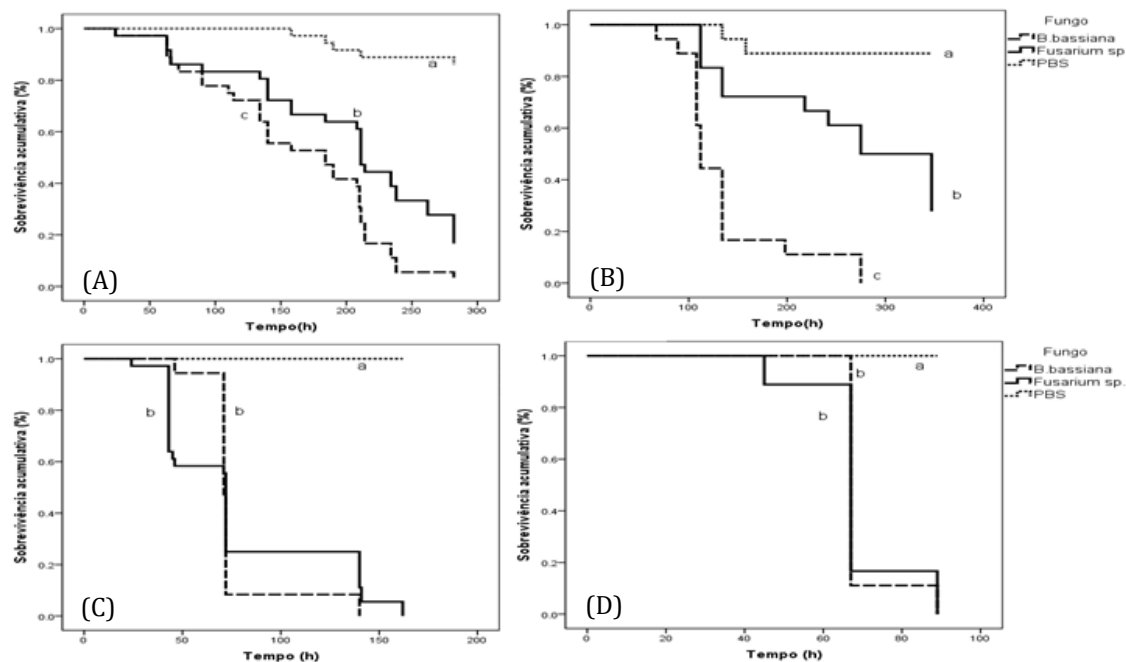


Figura 2 – Curvas de sobrevivência das larvas infetadas pelo fungo *Fusarium* spp. e respetivos controlos (A) Método de imersão a 30°C. (B) Método de imersão a 25°C. (C) Método de injeção a 30°C. (D) Método de injeção a 25°C. As curvas identificadas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

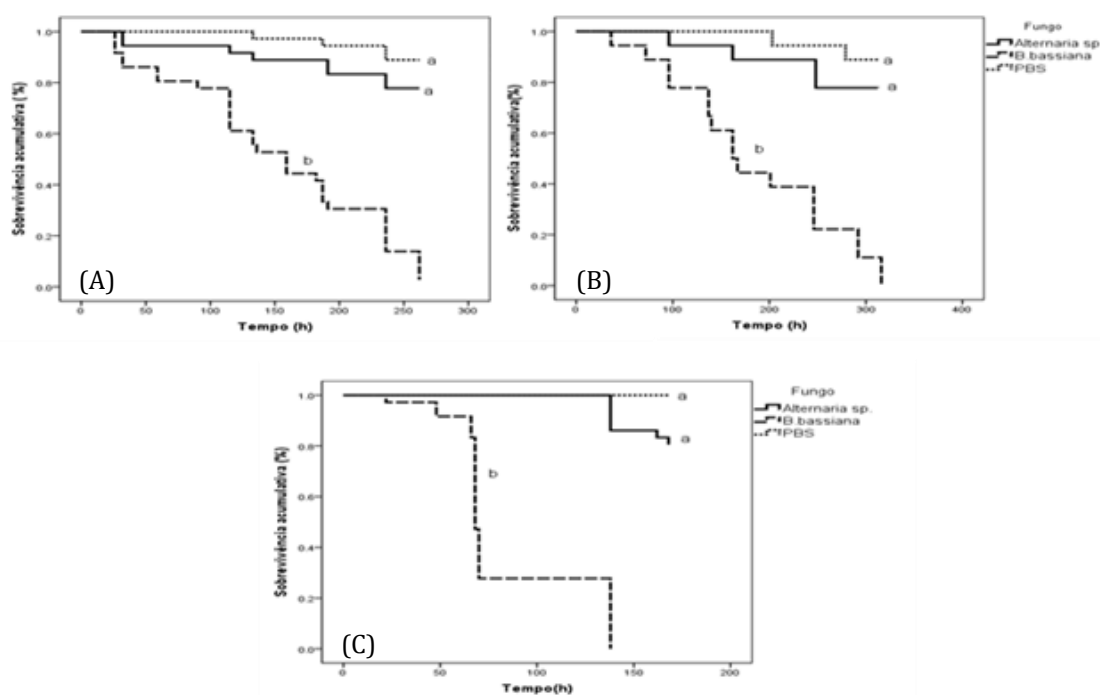


Figura 3 – Curvas de sobrevivência das larvas infetadas pelo fungo *Alternaria* spp. e respetivos controlos (A) Método de imersão a 30°C. (B) Método de imersão a 25°C. (C) Método de injeção a 30°C. As curvas identificadas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).