

Caracterização de um micoparasita de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem-asiática da soja

PILLA, T.C.S.¹; SILVA, E.²; GRAÇA, J.P.³; LUZ, M.A.M.⁴; BAIL, J.⁵; NUNES, E.⁶; SILVA, C.P.⁷; PILAU, E.J.⁸; BONUGLI-SANTOS, R.C.⁹; SEIXAS, C.D.S.¹⁰

¹Unopar, bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, tatianepilla@outlook.com; ²Doutorando, Universidade Estadual de Maringá; ³Pós-doutorando, Universidade Estadual de Maringá/ Embrapa Soja; ⁴Unopar, bolsista Embrapa Soja; ⁵UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, bolsista; ⁶Pesquisadora, Embrapa Suínos e Aves; ⁷Professora, Unicesumar; ⁸Professor, Universidade Estadual de Maringá; ⁹Professora, UNILA; ¹⁰Pesquisadora, Embrapa Soja.

Introdução

Phakopsora pachyrhizi é o fungo causador da ferrugem-asiática da soja, doença que vem causando prejuízos desde a sua introdução no País, em 2001 (Godoy et al., 2016, 2017).

O sintoma mais comum aparece nas folhas, onde lesões se iniciam por minúsculos pontos mais escuros que o tecido sadio da folha, de coloração esverdeada a cinza-esverdeada. Na face abaxial, correspondente a esses pontos, surgem as urédias, estruturas de reprodução do fungo. Com o tempo as folhas amarelecem, secam e caem. A desfolha precoce é o principal dano da doença porque pode acarretar em perdas de produtividade e/ou queda na qualidade dos grãos (Henning et al., 2014; Hartman et al., 2015; Godoy et al., 2017).

Uma das estratégias de controle da ferrugem-asiática é o uso de fungicidas. Apesar de relativamente eficazes, a intensa utilização de fungicidas tem levado a seleção de patógenos resistentes (Godoy et al., 2016). Nesse contexto, há necessidade de se buscar alternativas que possam compor o sistema de manejo da doença.

Uma dessas alternativas é o controle biológico ou biocontrole, que nesse caso é o uso de um microrganismo não fitopatogênico, um antagonista, para controlar *P. pachyrhizi*. Os mecanismos de ação de agentes de biocontrole de doenças são divididos em antibiose, indução de resistência, competição, parasitismo, predação e promoção de crescimento. Qualquer interferência negativa do antagonista resulta no controle biológico da doença (Medeiros et al., 2018).

Em 2006, na Embrapa Soja, em Londrina, PR, em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação, com sintomas de ferrugem-asiática, foi observado um fungo crescendo sobre urédias de *P. pachyrhizi*. Lâminas foram montadas para observação das estruturas do fungo, que preliminarmente foi identificado como *Simplicillium lanosoniveum*. Em 2011, o fungo foi isolado e incorporado à Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja, com o código CMES 937.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o micoparasita de *P. pachyrhizi* e verificar seu potencial como agente de biocontrole.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Embrapa Soja, em Londrina, PR, e no Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP) na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, PR.

Para caracterizar o isolado CMES 937, o mesmo foi repicado para placas contendo meio a base de batata, dextrose e ágar (BDA), incubado em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, por 14 dias, para posterior observação do aspecto da colônia e para montagem de lâminas e microculturas para facilitar a observação e a medição das estruturas reprodutivas. Além disso, foi feita inoculação desse isolado em plantas com sintomas de ferrugem asiática para posterior observação da interação entre os fungos ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Montagem de microculturas

A microcultura foi feita adaptando procedimento descrito por Mafia e Alfenas (2016). Colocou-se três blocos de meio batata-dextrose-ágar (BDA), com cerca de 0,7 cm² e 4-5 mm de espessura, numa lâmina de vidro para microscopia, previamente limpa e esterilizada por flambagem. Com um estilete flambado tocou-se na colônia do micoparasita e depois no centro de uma das faces laterais de um dos blocos de BDA, para transferir esporos e/ou micélio para o mesmo. Esse procedimento foi feito para as quatro faces dos três blocos de ágar-água. Após, cada bloco foi coberto com uma lamínula, esteri-

lizada por flambagem, que foi pressionada levemente para fixação. A lâmina foi colocada em câmara úmida formada com uma placa de Petri esterilizada, contendo no fundo papel-filtro umedecido com água. Para evitar o contato com o papel-filtro úmido, a lâmina foi colocada sobre outras lâminas limpas e flambadas. A água e o papel-filtro foram esterilizados. Foram montadas duas microculturas. As placas contendo as lâminas foram mantidas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após três dias a lâmina foi retirada da câmara úmida, cada lamínula foi removida com auxílio de um estilete e colocada sobre outra lâmina contendo ao centro uma gota de lactofenol.

Outras preparações para medição das estruturas

Lâminas contendo estruturas do micoparasita foram preparadas a partir de folhas de soja com sintomas/sinais de ferrugem-asiática e a presença do micoparasita recém-coletadas em casa de vegetação, e a partir de placas com colônia do micoparasita. Com um estilete flambado tocou-se na lesão ou na colônia e tocou-se em uma gota de lactofenol depositado no centro de uma lâmina, para transferir micélio e esporos do micoparasita, e cobriu-se com lamínula.

Medição das estruturas

As lâminas contendo estruturas do micoparasita foram observadas e medidas ao microscópio óptico, com ocular micrométrica, com aumento de 1000 vezes. Foram medidos 50 esporos em cada tipo de lâmina (cultura; folha).

Observação da interação do micoparasita com *P. pachyrhizi* ao microscópio eletrônico de varredura

Plantas de soja do genótipo PI636463, suscetível à ferrugem-asiática, foram cultivadas em vasos em casa de vegetação. Foram preparados 12 vasos, sendo que em cada um foram colocadas quatro sementes com posterior desbaste, restando duas plantas por vaso. Quando as plantas estavam entre os estádios V3 e V4 foram inoculadas por aspersão, com *P. pachyrhizi*, utilizando-se esporos coletados a campo para o preparo da suspensão, com con-

centração de $3,6 \times 10^4$ esporos mL^{-1} . Após 14 dias o micoparasita foi inoculado em plantas de nove vasos, que já apresentavam claros sintomas/sinais de ferrugem-asiática. As plantas de três vasos não receberam o micoparasita. Para preparo do inóculo, o isolado CMES 937 foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA, em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, por oito dias. Foram preparadas 10 placas. Após o período de incubação em cada placa foram colocados 20 mL de água esterilizada, foi feita leve raspagem usando alça de Grigalski para liberação dos esporos. A suspensão obtida em cada placa foi transferida para um béquer. Com auxílio de câmara de Neubauer foi feita a contagem de esporos e a concentração foi ajustada para $3,6 \times 10^4$ esporos mL^{-1} . A essa suspensão foram adicionados 250 μL de etanol 70% como agente dispersor. A inoculação foi feita por aspersão. Para garantir elevada umidade, tanto após a inoculação com *P. pachyrhizi*, quanto após a inoculação com o micoparasita, as plantas foram submetidas à nebulização automática a cada 2 h, por um período de 14 horas (19:00; 20:00; 22:00; 00:00; 03:00 e 08:00) com 40 segundos por horário de nebulização.

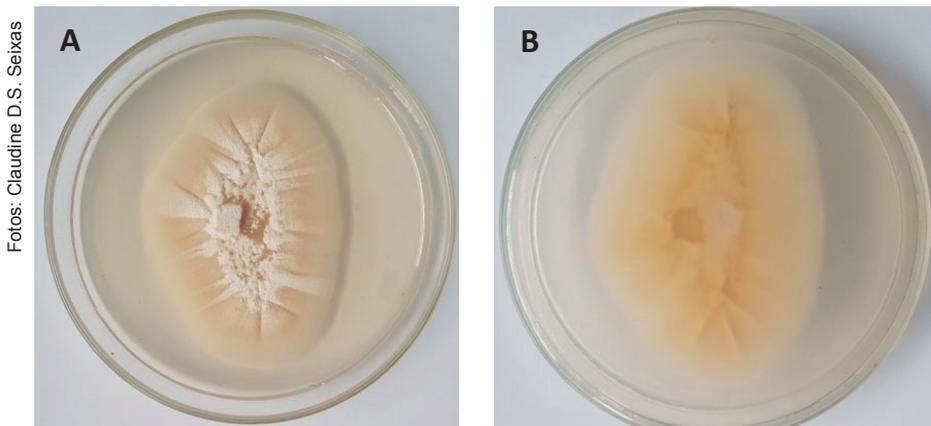
Folhas foram coletadas nos períodos de dois dias, cinco dias e 14 dias após a inoculação. Em cada período foi coletado um trifólio de cada planta de três vasos. O trifólio foi cortado, levado ao laboratório, onde com auxílio de microscópio estereoscópio, foram cortados seis fragmentos de 0,5 cm^2 do limbo foliar, contendo urédias de *P. pachyrhizi* com o micoparasita, evitando as nervuras. Os fragmentos foram depositados em microtubos contendo solução fixadora (glutaraldeído, tampão cocadilato e água destilada). Os microtubos foram identificados e colocados em uma caixa de papelão, que foi mantida em geladeira, para posterior envio à UEM.

No COMCAP-UEM, as amostras foram desidratadas em uma série de etanol (10%; 20%; 30%; 40%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90%) culminando em 100%, foram secas em ponto crítico e fixadas em suportes próprios (stubs). Os stubs foram revestidos por aspersão com ouro. As amostras foram visualizadas e fotografadas com microscópio eletrônico de varredura Quanta, modelo 250, marca Thermo Fischer Scientific/Philips, operando em alto vácuo, usando voltagem de 20kv e intensidade de corrente de 30 μA .

Resultados e Discussão

Caracterização do micoparasita

Após 14 dias de incubação o micoparasita tomou em torno de 70% da placa de Petri, de 9 cm de diâmetro (Figura 1). A colônia tem textura cerosa com sulcos e bordos camurçados; com o passar do tempo em alguns pontos da colônia a textura fica cotonosa (Figura 1A). Quanto a coloração, é creme a amarelo-claro e, com o passar do tempo a parte mais velha fica esbranquiçada (Figura 1A). O reverso da colônia é creme a amarelo-claro (Figura 1B). Esporulação abundante. Presença de zonação diurna. Hifas hialinas. Conidióforos hialinos, não ramificados. Células conidiogênicas fialídicas, terminais. Conídios hialinos, agrupados em massa muscilagnosa, unicelulares, elipsoides, arredondados nas extremidades, paredes lisas. Quanto as medidas houve pequena variação no comprimento quando os esporos foram obtidos diretamente de folha fresca e quando obtidos após cultivo em meio de cultura: 3-5 μm x 2-3 μm (folha fresca); e 4-6 μm x 2-3 μm (cultura).



Fotos: Claudine D.S. Seixas

Figura 1. Aspecto da colônia (A) e reverso (C) da colônia do micoparasita de *P. pachyrhizi*. *Simplicillium lanosoniveum* foi relatado como micoparasita de *P. pachyrhizi* (Ward, 2011) e também de outras ferrugens (Baiswar et al., 2014).

Apesar da semelhança, o tamanho dos esporos do isolado CMES 937, utilizado nesse trabalho, não condizem com as descritas para *Simplicillium lanosoneum* (Zare; Gams, 2001). Com base nas características encontradas trata-se do gênero *Acremonium* (Hawksworth, 1979). Também nesse gênero há espécies descritas para controle biológico de ferrugens (Jayapal-Gowdu; Balasubramanian, 1993). Para confirmar e verificar a espécie do micoparasita estão sendo realizados testes moleculares.

Observação da interação do micoparasita com *P. pachyrhizi* ao microscópio eletrônico de varredura

Comparando as imagens obtidas ao MEV de estruturas reprodutivas de *P. pachyrhizi* sem o micoparasita associado (Figura 2A) com as obtidas de estruturas após dois dias de inoculação com o micoparasita percebe-se um intenso desenvolvimento de hifas do micoparasita entrelaçando uredosporos de *P. pachyrhizi* e o início da murcha desses uredosporos (Figura 2B).

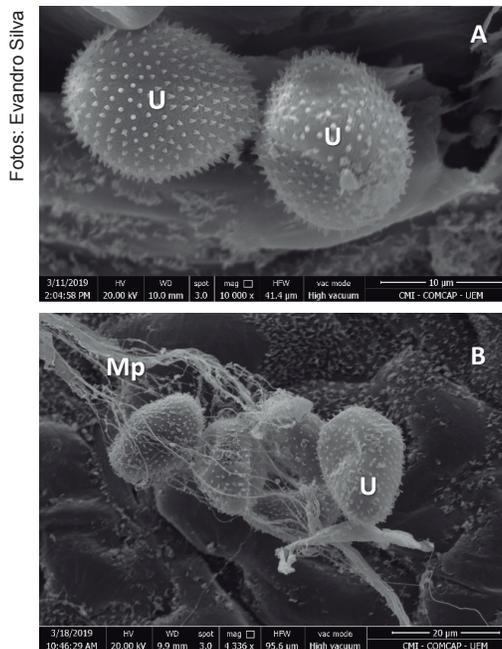


Figura 2. Uredosporos (U) de *P. pachyrhizi* na ausência do micoparasita (Mp) (A) e aos dois dias após a inoculação com o micoparasita (B). Aos cinco dias observa-se uredosporos totalmente murchos, inclusive dentro da urédia (Figura 3).

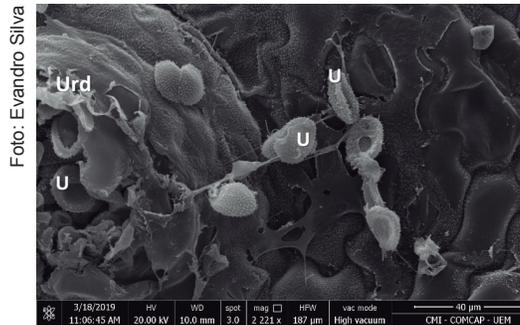


Figura 3. Urédia (Urd) e uredosporos (U) de *P. pachyrhizi* aos cinco dias após a inoculação com o micoparasita.

Aos 14 dias a colonização das estruturas de *P. pachyrhizi* pelo micoparasita é intensa e a maioria dos uredosporos está murcha (Figura 4).

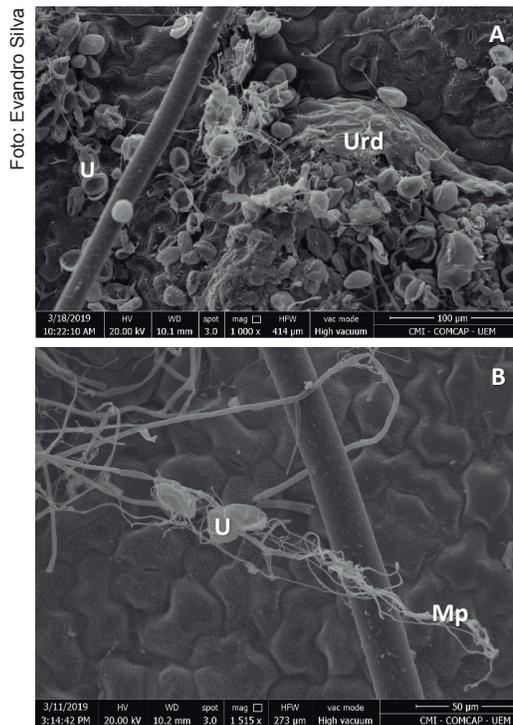


Figura 4. Urédia (Urd) com uredosporos (U) (A) e uredosporos (B) de *P. pachyrhizi* aos 14 dias após a inoculação com o micoparasita (Mp).

Pelo observado nessa fase do trabalho, o micoparasita cresce e se multiplica bem em um meio de cultura que é de baixo custo e de fácil produção, e é capaz de inviabilizar uredosporos de *P. pachyrhizi*, portanto tem potencial para controle biológico desse patógeno. Além dessas características, um agente de biocontrole deve ser geneticamente estável e não sofrer variação em suas atividades antagônicas entre as gerações; ser efetivo a baixas concentrações; ser compatível com outros métodos de controle e não ser patogênico ao homem e nem às plantas (Medeiros et al., 2018). Os estudos continuam para verificar se o micoparasita encontrado tem todas essas características e pode ser um bom agente de controle biológico.

Conclusão

O micoparasita de *P. pachyrhizi* pertence ao gênero *Acremonium* e tem potencial para biocontrole.

Referências

- BAISWAR, P.; NGACHAN, S. V.; RYMBAI, H.; CHANDRA, S. *Simplicillium lanosoniveum*, a hyperparasite on *Aecidium elaeagni-latifoliae* in India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 9, p. 144, 2014.
- GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 407-421, 2016.
- GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MEYER, M.; COSTAMILAN, L. M.; ADEGAS, F. S. **Boas práticas para o enfrentamento da ferrugem-asiática da soja**. Embrapa Soja: Londrina, PR, 2017. 6p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico. 92). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/163428/1/ComTec92-OL.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- HARTMAN, G. L.; SIKORA, E. J.; RUPE, J. C. Rust. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests**. 5. ed. Saint Paul: APS Press, 2015. p. 56-59.
- HAWKSWORTH, D. L. The lichenicolous Hyphomycetes. **Bulletin fo the British Museum for Natural History**, v. 6, n. 3, p. 183-300, 1979.
- HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76 p. (Embrapa Soja. Documentos, 256).

JAYAPAL-GOWDU, B.; BALASUBRAMANIAN, R. Biocontrol of rust of groundnut by *Acremonium obclavatum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 71, p. 639-643, 1993.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em fitopatologia**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p. 207-223.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Princípios e conceitos. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda., 2018. v.1, p. 261-274.

WARD, N. A.; SCHNEIDER, R. W.; AIME, M. C. Colonization of soybean rust sori by *Simplicillium lanosoniveum*. **Fungal Ecology**, v. 4, n. 5, p. 303-308, 2011.

ZARE, R.; GAMS, W. A. A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, v. 73, p. 1-50, 2001.