

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FUNGOS NEMATÓFAGOS ASSOCIADOS a *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni*

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF NEMATOPHAGOUS FUNGI ASSOCIATED *Tylenchulus semipenetrans* AND *Pratylenchus jaehni*

Paulo Roberto Pala MARTINELLI¹; Jaime Maia dos SANTOS²

1. Doutorando, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. prpmartinelli@yahoo.com.br; 2. Professor, Doutor, Departamento de Fitossanidade – FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

RESUMO: Fungos nematófagos têm sido estudados como uma alternativa promissora para o manejo de nematóides dos citros. Este estudo teve por objetivo documentar ao microscópio eletrônico de varredura as estruturas morfológicas marcantes para a identificação das principais espécies de fungos nematófagos envolvidas no estudo e comprovar a patogenicidade dos isolados associados a *T. semipenetrans* e *P. jaehni*, presentes em solos de pomares de citros do estado de São Paulo. Isolados obtidos em pomares de citros, principalmente do Estado de São Paulo, foram estudados no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal-SP. Os dados obtidos nesse estudo confirmaram que a microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta eficaz para auxiliar no entendimento do modo de ação dos fungos nematófagos: *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides*, *A. robusta*, *A. musiformis*, *Dactylella leptospora*, *Monacrosporium eudermatum* e *M. elegans*; revelaram detalhes de suas estruturas reprodutivas e de captura, confirmando a patogenicidade dos isolados a *T. semipenetrans* e *P. jaehni*; bem como auxiliando na identificação de alguns isolados.

PALAVRAS-CHAVE: Microscopia eletrônica de varredura. Fungos predadores. *Arthrobotrys* spp., *Monacrosporium* spp., *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni*.

INTRODUÇÃO

Dentre os agentes de controle biológico de nematóides os fungos nematófagos são uma opção para o manejo integrado desses patógenos. Os fungos nematófagos podem ser divididos em predadores, endoparasitos, oportunistas (parasitos de ovos, cistos e de fêmeas sedentárias), e aqueles que produzem metabólitos tóxicos aos nematóides (SOARES, 2006). Os fungos predadores formam armadilhas de diferentes tipos (RUBNER, 1996), dentre elas: hifas adesivas não-modificadas; ramificações hifais anastomosadas, formando redes adesivas tridimensionais e bidimensionais; ramificações adesivas formadas por uma ou mais células; nódulos adesivos; anéis constritores; e anéis não-constritores (GRAY, 1988).

A ocorrência de fungos predadores e oportunistas tem sido constatada por vários pesquisadores a partir de amostras de solo e raízes, e a partir de cistos e/ou massas de ovos de nematóides fitoparasitos (FERRAZ et al., 1992; MAIA et al., 1993; LIMA, 1996; SANTOS, 1996; MIZOBUTSI et al., 1999; RIBEIRO et al., 1999; MAIA, 2000; GENÉ et al., 2005; MARTINELLI et al., 2009). Contudo, em pomares de citros as pesquisas com fungos nematófagos tiveram início a partir da

década de 80 principalmente na Flórida e Espanha (MARTINELLI, 2009).

GENÉ et al., 2005 observaram que, em 69% dos pomares amostrados na região da Catalunha, Espanha haviam fungos nematófagos associados a *T. semipenetrans* sendo que as espécies predominantes eram de *Arthrobotrys*.

Martinelli e Santos (2007ad), em estudo de detecção e isolamento de fungos nematófagos associados a *T. semipenetrans*, no Estado de São Paulo, isolaram 26 fungos, dentre os quais, 14 eram parasitas do nematóide. Testes *in vitro* com diferentes espécies de fungos nematófagos, revelaram que, pelo menos, três espécies de *Arthrobotrys*, além de *Monacrosporium* sp. e *Dactylella* sp. tinham expressivo potencial como agentes do controle biológico de *P. jaehni* Martinelli e Santos (2007bc).

Exames de nematóides capturados por fungos nematófagos, ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), são úteis para elucidar o modo de ação desses agentes e auxiliar na compreensão de como esses organismos interagem entre si (BARRON, 1977; DOWSETT; REID, 1977; JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1988; LOPES-LORCA; DUNCAN, 1991; MAIA; SANTOS, 1995; MAIA; SANTOS, 1999; MAIA, 2000).

Este estudo teve por objetivo documentar ao microscópio eletrônico de varredura as estruturas morfológicas marcantes para a identificação das principais espécies de fungos nematófagos envolvidas no estudo e comprovar a patogenicidade dos isolados associados a *T. semipenetrans* e *P. jaehni*, presentes em solos de pomares de citros do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP.

Os isolados utilizados no estudo foram obtidos como descrito por Martinelli (2009), sendo incluído um isolado de cada um dos fungos: *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis*, *A. robusta*, *A. conoides*, *Monacrosporium eudermatum*, *M. elegans* e *Dactylella leptospora*.

O preparo das amostras para a documentação ao MEV foi realizado a partir de culturas puras dos fungos nematófagos, as quais foram repicadas para placas de Petri contendo ágar-água a 2 % e incubadas em B.O.D., à temperatura de 25 ± 1 °C, no escuro, por 5 dias. A seguir, 1 mL de suspensões contendo 100 espécimes de *Tylenchulus semipenetrans* ou de *Pratylenchus jaehni* foi vertido na placa, e essas culturas foram novamente incubadas como anteriormente mencionado. Quando se observaram 50 ou mais nematóides predados e estruturas reprodutivas dos fungos, procedeu-se à fixação em glutaraldeído a 3%, em tampão de fosfato de potássio a 0,05 M e pH 7,2 a 7,4. Uma lâmina da solução de glutaraldeído, apenas para cobrir a superfície do meio, foi aplicada às placas, e essas foram mantidas em geladeira ($5 - 8$ °C) por 72 h. Em seguida, a solução de glutaraldeído foi removida das placas, e as culturas foram cuidadosamente lavadas com a solução tampão pura. Pequenas porções do meio contendo nematóides capturados, estruturas de captura do fungo ou conídios foram removidos do meio e transferidos para vidros de boca larga e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2%, no mesmo tampão e na mesma temperatura, por 12 h. Então, foram novamente lavadas, desidratadas em uma série gradual de acetona, secas em secador de ponto crítico, montadas em porta-espécimes, recobertas com uma camada de 36 nm de ouro paládio e elétrôn-micrografadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operando em 15 kV (MAIA; SANTOS, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As observações em MEV evidenciaram detalhes do crescimento de *A. musiformis* no meio agar-água (Figura 1A). Conidióforos do fungo apresentam forma de candelabro com esterigmas apicais ramificadas (Figura 1B), semelhante ao observado por LIMA (1996). Detalhes da captura de um espécime de *P. jaehni* pelo anel constritor de *D. leptospora* e o detalhe do anel constritor com três células infladas puderam também ser observados (Figuras 1C e 1D).

Na opinião de Nodbring-Hertz (1973), a presença do nematóide é indispensável para que ocorra a atividade das estruturas de captura. Conídio de *M. elegans* com quatro células conidiógenas de formato oblongo fusiforme, com a segunda célula inflada, é observado na Figura 1E. Isto esta de acordo com as características mencionadas por Dowsett et al. (1984). A captura de um espécime de *P. jaehni* pelo fungo e a estrutura de captura na forma de rede adesiva tridimensional podem ser observadas na Figura 1F(seta), e estão conforme o descrito por Rubner (1996).

Observando a Figura 2A, notamos o início da formação de uma rede adesiva de *A. robusta*, como havia sido observado por Lima (1996) em sua caracterização de isolados dessa espécie. A captura de um espécime de *P. jaehni* pela rede adesiva de *A. robusta* é observada na Figura 2B. Na Figura 2C, ilustrou-se o conídio de *A. musiformis* com formato elipsoidal-alongado a musiforme, bicelular com septo inframediano (seta), conforme a caracterização da espécie elaborada por Lima (1996). Um espécime de *P. jaehni* é capturado por redes bidimensionais de *A. musiformis* (Figura 2D), enquanto o conídio de *A. oligospora* no formato obovóide a piriforme, bicelular, com septo inframediano (seta), com ligeira constrição no septo, coincidindo com a descrição da espécie elaborada por Barron (1977) e Lima (1996), é observado na Figura 2E. Na Figura 2F, observa-se um espécime de *P. jaehni* capturado por uma rede adesiva bidimensional de *A. oligospora*.

Observa-se, na Figura 3A, um espécime de *T. semipenetrans* preso à rede tridimensional de *M. elegans* e na Figura 3B, é observada a anastomose das redes tridimensionais de *M. elegans*. Para *A. oligospora*, observam-se redes adesivas (Figura 3C) e a captura de um espécime de *T. semipenetrans* por essas estruturas (Figura 3D).

Um espécime de *T. semipenetrans* está preso em rede adesiva bidimensional formada pelo fungo *M. eudermatum* (Figura 3E). Detalhes do conídio com 3 septos, constrição característica e as

quatro células conidiógenas, como anteriormente observado por Maia (2001) em observações ao

MEV com essa espécie de fungo nematófago, apareceram na Figura 3F.

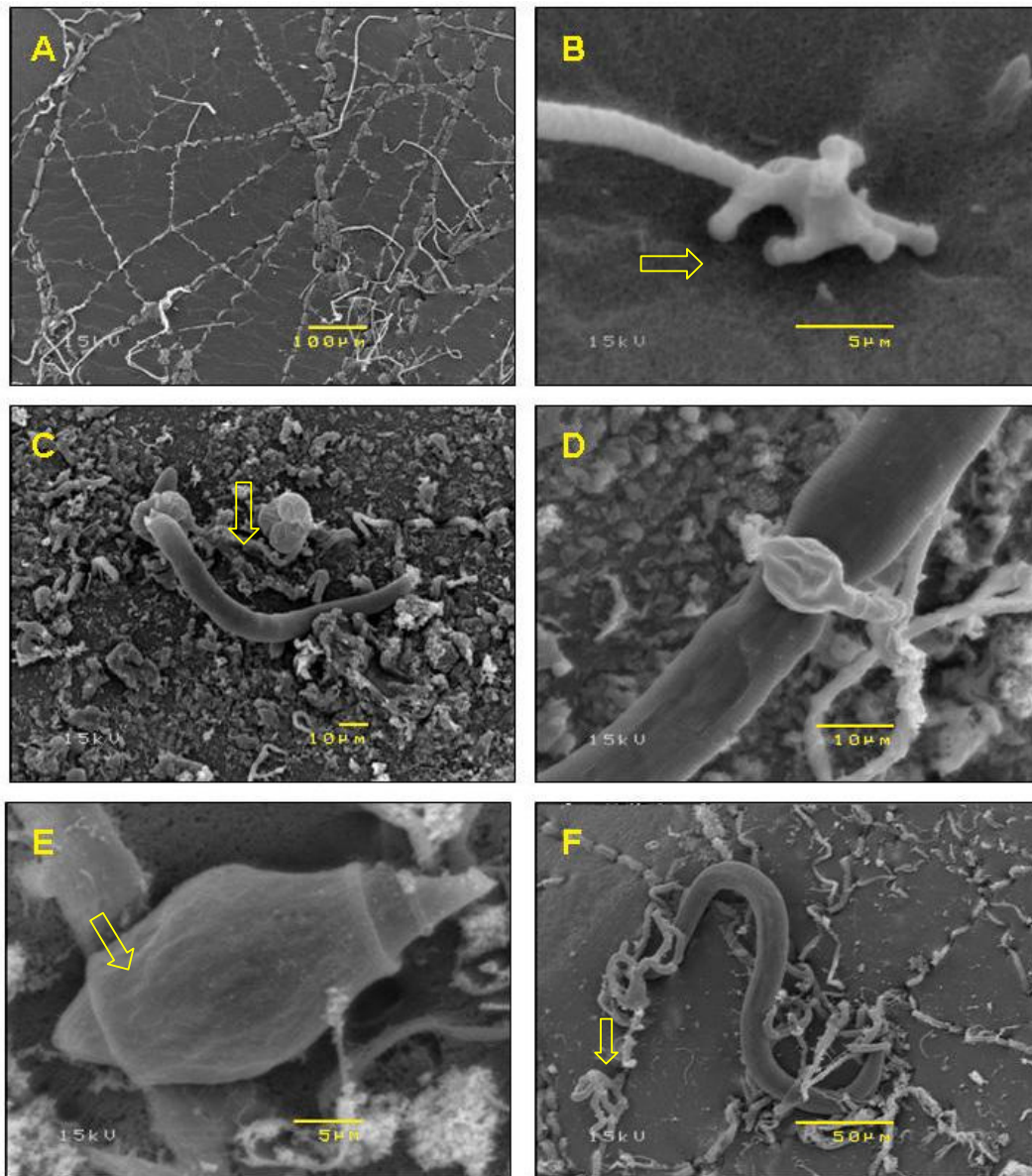


Figura 1: Eletromicrografia de órgãos de captura de fungos nematófagos isolados de amostras de solo de pomares de citros no Estado de São Paulo. A) Aspecto geral do meio de cultura B) Conidióforo de *A. musiformis*; C) *Pratylenchus jaehni* capturado pelo anel constritor de *Dactylella leptospora* e detalhe do anel constritor com três células infladas (seta); D) Detalhe do anel constritor de *D. leptospora*; E) Conídio de *Monacrosporium elegans*; F) *P. jaehni* capturado por *M. elegans*.

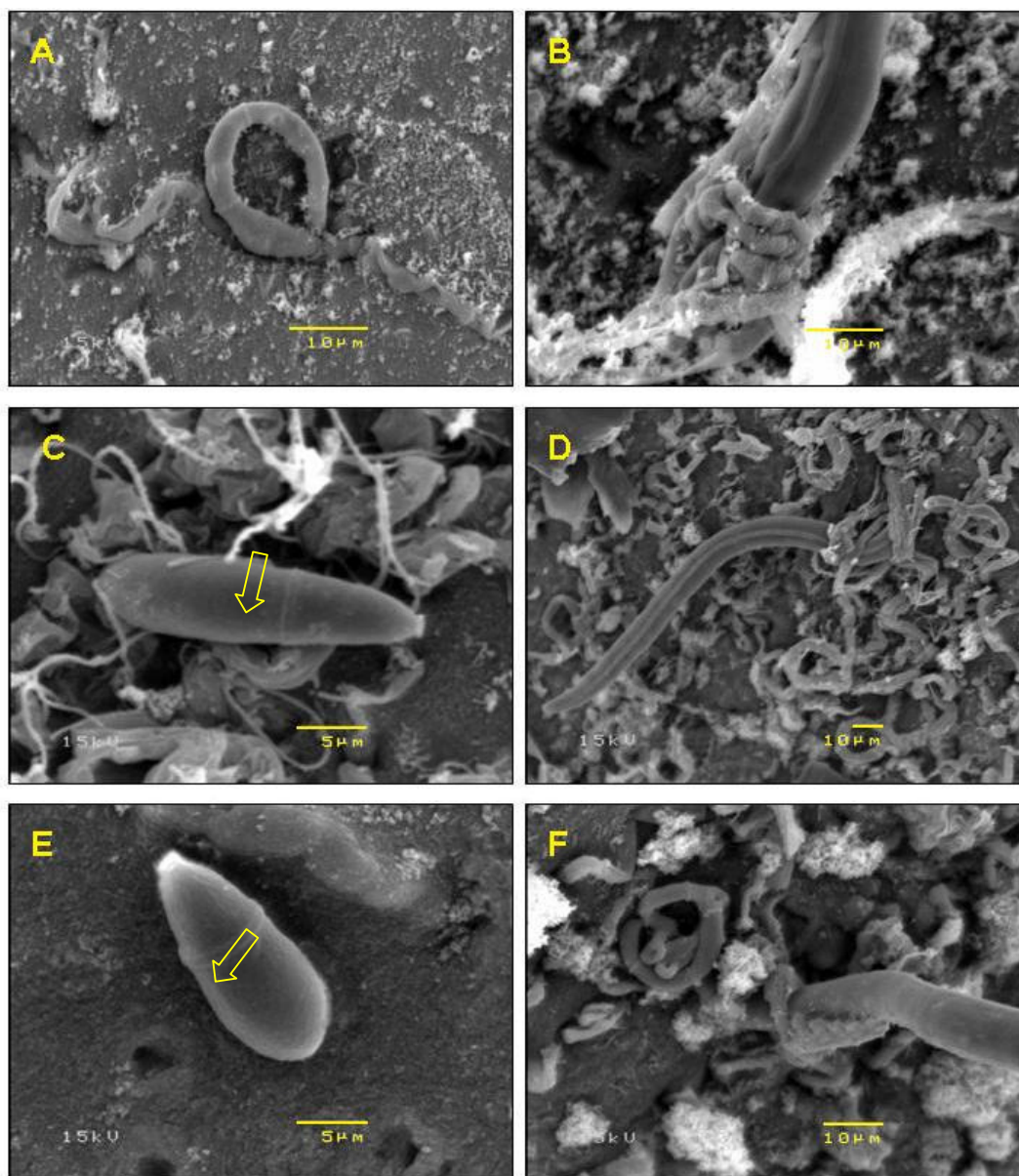


Figura 2: Eletromicrografia de órgãos de captura de fungos nematófagos isolados de amostras de solo de citros no Estado de São Paulo. A) Início da anastomose da rede adesiva de *Arthrobotrys robusta*; B) Detalhe do nematóide *P. jaehni* capturado por *A. robusta*; C) Conídio *A. musiformis*; D) *P. jaehni* capturado por *A. musiformis*; E) Conídio de *A. oligospora*; F) *P. jaehni* capturado por *A. oligospora*.

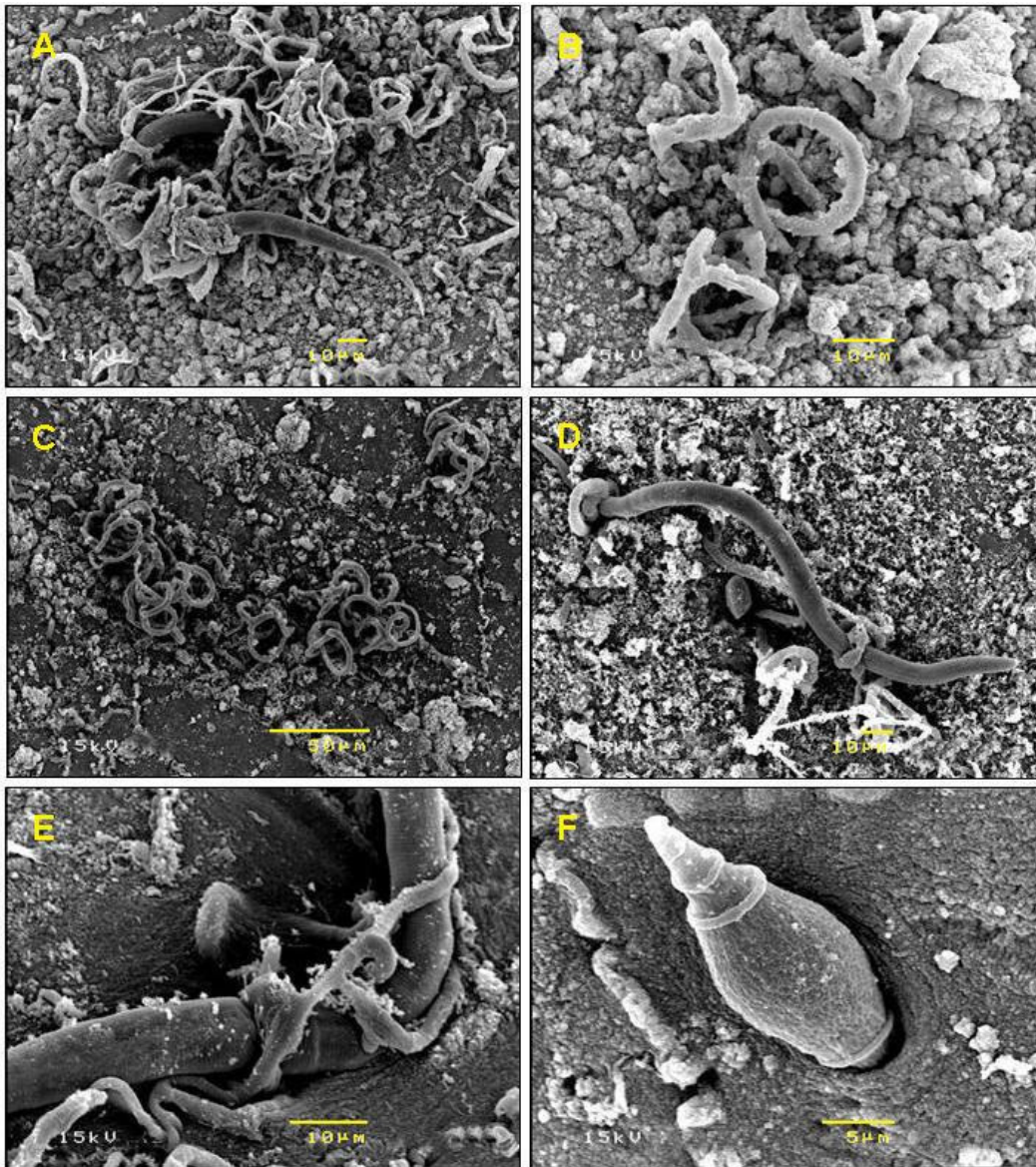


Figura 3: Eletromicrografia de órgãos de captura de fungos nematófagos isolados de amostras de solo de citros no Estado de São Paulo. A) *Tylenchulus semipenetrans* capturado por *Monacrosporium elegans*; B) Rede bidimensional de *M. elegans*; C) Órgãos de captura de *Arthrobotrys oligospora*; D) *T. semipenetrans* capturado por *A. oligospora*; E) *T. semipenetrans* capturado por *M. eudermatum*; F) Conídio de *M. eudermatum*.

Na Figura 4A, observam-se espécimes de *T. semipenetrans* capturados por redes adesivas de *A. robusta*. Enquanto, na Figura 4B, estão ilustrados conídios de *A. robusta* com formato obovóide, bicelulares com septo inframediano conforme a descrição elaborada por Lima (1996). A Figura 4C é pertinente a um conjunto de conídios de *A. musiformis* produzidos em um arranjo radiado e não-adensado, enquanto a Figura 4D ilustra um

espécime de *T. semipenetrans* capturado por uma rede adesiva de *A. musiformis*.

Nas Figuras 4E e F, são apresentados detalhes de um espécime de *T. semipenetrans* capturado por redes adesivas de *A. conoides*.

Os tipos de armadilhas e estruturas reprodutivas dos fungos nematófagos documentados no presente estudo estão de acordo com as descrições elaboradas por outros pesquisadores

(LIMA, 1996; RUBNER, 1996; MAIA, 2000; SOARES, 2006).

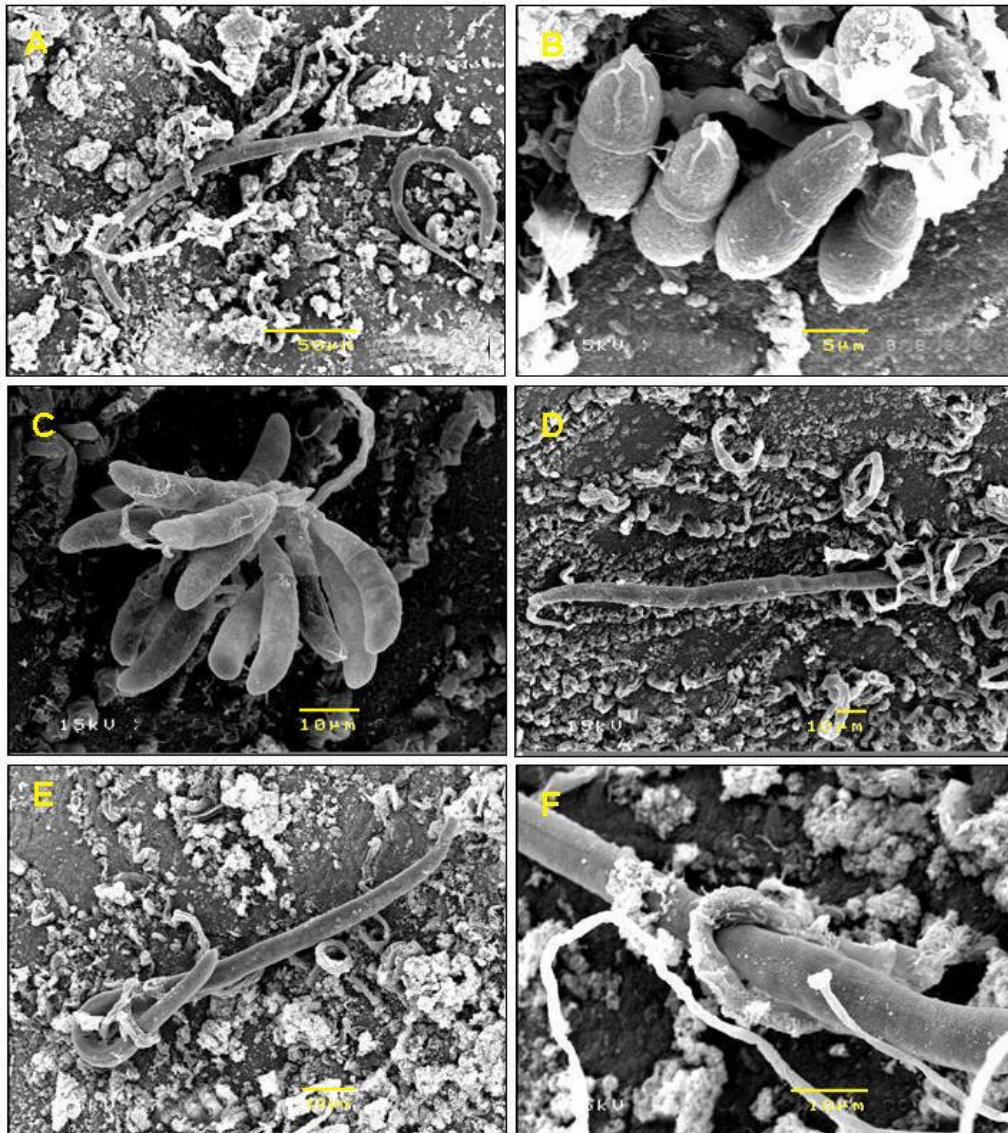


Figura 4: Eletromicrografia de órgãos de captura de fungos nematófagos isolados de amostras de solo de citros no Estado de São Paulo. A) *Tylenchulus semipenetrans* capturado por *Arthrobotrys robusta*; B) Conídios de *A. robusta*; C) Conídios de *A. musiformis*; D) *T. semipenetrans* capturado por *A. musiformis*; E-F) *T. semipenetrans* capturado por *A. conoides*.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no estudo confirmaram que a microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta eficaz para auxiliar no entendimento do modo de ação dos fungos nematófagos e revelar detalhes de suas estruturas reprodutivas e de

captura, confirmando a patogenicidade dos isolados a *T. semipenetrans* e *P. jaehni*.

ABSTRACT: Nematophagous fungi have been studied as a promising alternative for the management of nematodes of citrus. This study had the objective of documenting by scanning electron microscopy the outslading morphological structures for the identification of the main species of nematophagous fungi involved in the study and proving the pathogenicity of the isolated ones associated with *T. semipenetrans* and *P. jaehni*. Isolated came from in citrus orchards, mainly in São Paulo State, were studied in the Laboratory of Scanning Electron Microscopy of FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal-SP. The data obtained in this study have confirmed that the scanning electron microscopy is an effective tool to assist in the understanding of way of action of the nematophagous fungi: *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides*, *A. robusta*, *A. musiformis*, *Dactylella leptospora*, *Monacrosporium eudermatum* and *M. elegans* and to reveal details of their reproductive structures and the capture, to confirm the pathogenicity of the isolated to *T. semipenetrans* and *P. jaehni*, as well as to confirm the identification of some isolated.

KEYWORDS: Scanning electron microscopy. Predator fungi. *Arthrobotrys* spp. *Monacrosporium* spp. *Tylenchulus semipenetrans*. *Pratylenchus jaehni*.

REFERÊNCIAS

- BARRON, G. L. **The nematode-destroying fungi**. Ghelph: Canadian Biological Publications Ltda., 1977, 140p.
- DOWSETT, J. A.; REID, J. Observations on the trapping of nematodes by *Dactylaria scaphoides* using optical, transmission and scanning-electron-microscopic techniques. **Mycology**, New York, v. 71, p. 379-391, 1977.
- DOWSETT, J. A.; REID, J.; KALKAT, R. S. A New species of *Dactylella*. **Mycologia**. Stanford, v. 76, n. 3, p. 563-566, 1984.
- FERRAZ, S., MAIA, A.S., MUCHOVEJ, J.J.; SANTOS, J.M. dos. Detecção, isolamento, identificação e avaliação "in vitro" da capacidade predatória de fungos nematófagos de solos brasileiros. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 16 p. 85-86, 1992.
- GENÉ, J.; VERDEJO-LUCAS, S.; STCHIGEL, A. M.; SORRIBAS, F. J. AND GUARRO, J. Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 721 – 731, 2005.
- GRAY, N. F. Fungi attacking vermiform nematode. In: POINAR JUNIOR, G. O.; JANSSON, N. B. **Disease of nematodes**. Boca Raton, 1988. p. 3-38.
- JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection events in the fungus-nematode system. In: PAINAR Fr., G. O.; JANSSON, H. G. **Disease of nematodes**. Boca Raton, 1988, v.2. p. 59-72.
- LIMA, R. D. **Caracterização de Isolados e Avaliação da Patogenicidade de *Arthrobotrys* spp. a Fitonematóides**. 1996. 88f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- MAIA, A. S. **Isolamento, identificação e potencialidade de fungos como agentes de biocontrole de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines***. 2000. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal, Jaboticabal, 2000.
- MAIA, A. S.; GRAMINHA, E. B. N.; NUNES, T. L. S.; VERONEZ, V. A.; SANTOS, J. M.; OLIVEIRA, J. C. Microscopia eletrônica de varredura da habilidade predatória de agentes do biocontrole de nematóides. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 113-120, 2001.
- MAIA, A. S.; FERRAZ, S.; DALLA PRIA, M. Detecção, isolamento e identificação de *Monacrosporium* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17; 1993, Jaboticabal, **Resumos...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1993. p. 69.

MAIA, A.S.; SANTOS, J.M. dos. Microscopia eletrônica de varredura das estruturas de captura de alguns fungos nematófagos. In: INTERAMERICAM CONFERENCE ON ELECTRON MICROSCOPY, 3, 1995, Caxambu. **Anais...** Caxambu: [s.n.], 1995. p. 304.

MAIA, A. S., SANTOS, J. M. dos. A SEM technique for preparing biological control agents of nematodes in action. **Acta Microscopica**, Caracas, v. 7, Suppl. B, 1997. p. 550.

MAIA, A. S.; SANTOS, J. M. dos. SEM study of nematophagous fungi in action. **Acta Microscopica**, Caracas, v. 8, n. Suppl. C, p. 625-617, 1999.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. dos. Detecção e isolamento de fungos nematófagos de *Tylenchulus semipenetrans* em amostras de solo de pomares de citros do estado de São Paulo. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 30, 2007, Jaboticabal, **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 33, supl., p. 23, 2007a.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. dos. Patogenicidade in vitro de espécies de *Arthrobotrys* a *Pratylenchus jaehni*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 30, 2007, Jaboticabal, **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 33, supl., p. 23, 2007b.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. dos. Patogenicidade in vitro de *Monacrosporium* sp. e *Dactylella* sp. a *Pratylenchus jaehni*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 27, 2007, Goiânia, **Resumos...** Goiânia: SBN, 2007. p. 53c.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. dos. Patogenicidade in vitro de espécies de *Arthrobotrys* a *Tylenchulus semipenetrans*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 27, 2007, Goiânia, **Resumos...** Goiânia: SBN, p.54, 2007d.

MIZOBUTSI, E. H.; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R. C. F.; MENEZES, M. Isolamento de fungos de ovos de *Heterodera glycines* coletados em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 69-75. 1999.

NORDBRING-HERTZ, B. Peptide-induced morphogenesis in the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Physiologia Plantarum**, Frederiksberg, v. 29, p. 223-233, 1973.

RIBEIRO, R. C. F.; FERRAZ, S.; MIZOBUTSI, E. H.; MENDEZ, M. Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadores de nematóides em diversas regiões brasileiras. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 40-47, 1999.

RUBNER, A. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. **Studies in Mycology**. Berlin, n. 39, 1996.

SANTOS, M. A. **Detecção, identificação e avaliação do potencial antagonista de fungos nematófagos em solos do Brasil**. 1991. 97f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

SANTOS, M. A. **Estudo de alguns fungos endoparasitos e predadores no controle de fitonematóides**. 1996. 166f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.