

Utilização da microscopia como ferramenta para estudo do patógeno *Lecanicillium fungicola* e do seu efeito sobre o cogumelo *Agaricus bisporus*

RESUMO

O cogumelo *Agaricus bisporus* é conhecido no Brasil como champignon de Paris, sendo ainda o cogumelo mais cultivado no país. Uma das principais doenças que acometem esse cogumelo é a doença da bolha seca, causada pelo fungo *Lecanicillium fungicola*. Apesar disso, trata-se de uma doença ainda pouco estudada no Brasil e não há medidas de controle eficazes. O objetivo desse estudo foi avaliar a utilização da microscopia como ferramenta de estudo da interação entre estes dois fungos (*A. bisporus* e *L. fungicola*). As estruturas reprodutivas assexuadas do patógeno são facilmente observadas por microscopia ótica, facilitando a sua identificação. A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta de grande potencial porque permite visualizar a interação entre as hifas do patógeno e a estrutura diferenciada do cogumelo. Essa ferramenta será muito importante em estudos futuros visando o estabelecimento de métodos de controle do patógeno, com base nos danos que este pode causar sobre as hifas diferenciadas do cogumelo.

PALAVRAS-CHAVE: champignon, doença da bolha seca, MEV.

Lundoi Tobias Lee Correio

lundoilee@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6055-3972>

Tatiana S. Junqueira de Moraes Correio

tatianajunqueira2@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6055-3972>

Cibelli Paula de Castro Correio

cibellizoo@yahoo.com.br

<http://orcid.org/0000-0003-3028-056>

Eustáquio Souza Dias Correio

esdiasmicro@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0002-3030-3825>

INTRODUÇÃO

O cogumelo Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) é um dos cogumelos mais cultivados e consumidos no mundo. Esse cogumelo destaca-se devido às suas excelentes qualidades gastronômicas, além das características nutricionais e de uma série de potencialidades biotecnológicas (MILES e CHANG, 2004). Entretanto, assim como ocorre com qualquer outra espécie cultivada, o cultivo deste cogumelo sofre com o ataque de pragas e doenças, o que provoca perdas na produção.

Lecanicillium fungicola é o agente causal da doença da bolha seca (dry bubble), considerada a principal doença que acomete este cogumelo no Brasil e quiçá no mundo. Apesar de ser conhecido como patógeno de inúmeros basidiomicetos, o cogumelo *A. bisporus* é apontado como seu principal hospedeiro (BERENDSEN et al. 2010). O fungo é caracterizado por possuir conidióforos distintos, sendo ordenados em formas de espiral e varia de duas a cinco voltas de três a sete fiálides, as quais produzem conídios grandes e desiguais (ZARE e GAMS, 2008). Os sintomas da doença dependem do momento do cultivo no qual ocorre a infecção, podendo variar de sintomas brandos a severos. Normalmente ocorrem manchas amarronzadas, lesões necróticas, aspecto de couro e rompimento do estipe, o que inviabiliza a comercialização e o consumo dos cogumelos (BERENDSEN et al.2010; GEA e NAVARRO, 2017).

Apesar de bastante estudado em outros países, principalmente na Europa, este patógeno ainda é muito pouco estudado no Brasil. Em consequência disso, não há recomendações técnicas para o seu controle e muitos produtores sequer sabem ainda identificar a sua incidência nos cultivos comerciais. O objetivo desse estudo foi estabelecer metodologias de microscopia para permitir uma identificação simples do patógeno em laboratório, bem para o estudo da interação patógeno-hospedeiro, aspirando estudos futuros visando o seu controle.

METODOLOGIA

2.1 Obtenção dos isolados de *L. fungicola*

As cepas de *L. fungicola* foram obtidas e isoladas de cogumelos apresentando características da doença, coletados diretamente do local de cultivo, localizado em Barbacena – Minas Gerais, Brasil. Para realização do isolamento, foram cortados fragmentos de champignon que apresentaram sintomas da doença. Em cada fragmento contendo uma parte afetada e uma parte sadia, foi realizada assepsia de 30 segundos em álcool 70%. Posteriormente o material foi imerso em hipoclorito à 2% por um minuto e foi realizada lavagem em água destilada estéril por 3 vezes. Após a secagem em papel filtro, oito fragmentos foram depositados equidistantes em placas de Petri contendo os meios: BDA (batata 200g/L, dextrose 20g/L e ágar 15g/L) e Ágar Malte (extrato de malte 20g/L e Ágar 15g/L). Os antibióticos cloranfenicol (0,05g/L) e estreptomomicina (0,05g/L) foram adicionados aos dois meios e incubados em B.O.D a 25°C sob fotoperíodo.

2.1.1 Isolamento de culturas monospóricas de *L. fungicola*

Após o isolamento do patógeno, preparações microscópicas a fresco foram feitas com corante (azul de metileno) e sem corante, com o propósito de confirmar a produção de conídios e observação das estruturas reprodutivas. A partir da mesma colônia, foi preparada uma suspensão de conídios e uma alíquota foi espalhada em uma placa de Petri com ágar-ágar (água e 20g de ágar/L). A placa foi observada ao microscópio óptico e os conídios que se encontravam mais isolados foram transferidos unitariamente com auxílio de uma agulha para outra placa contendo meio extrato de malte. À medida que colônias começavam a se formar, as mesmas eram transferidas para placas contendo BDA. Novas lâminas foram preparadas a partir das culturas monospóricas para observação das estruturas reprodutivas e confirmação da espécie. A manutenção dos isolados foi feita através de repicagens sucessivas em meio BDA e Ágar Malte e incubação a 25°C.

2.2 Obtenção dos cogumelos de *A. bisporus*

O composto de cultivo do cogumelo foi obtido da empresa Sítio dos Micélios, na cidade de Barbacena, Minas Gerais. O composto, já colonizado, foi acondicionado em potes plásticos (700 g/pote) e coberto com uma camada de, aproximadamente 5cm de uma mistura de terra, areia, carvão vegetal moído e calcário. Primeiro, a terra foi misturada com calcário e areia, na proporção de 60, 30 e 10%, respectivamente. Depois, a essa mistura foi adicionado o carvão moído na proporção de 4 partes da mistura para 1 parte de carvão. O material assim preparado foi autoclavado a 121° C por 30 minutos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, a camada de cobertura foi adicionada sobre o composto. A camada de cobertura foi irrigada e mantida úmida durante todo o experimento. Durante o período de colonização da camada de cobertura, a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25° C. Após a completa colonização da camada de cobertura a temperatura foi reduzida para 18° C e assim mantida durante todo o período de cultivo do cogumelo.

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de *L. fungicola* e *A. bisporus* foram submetidas aos mesmos tratamentos para as análises de MEV, os quais estão descritos a seguir. Entretanto, para *L. fungicola*, foram utilizados discos da cultura fúngica crescida em meio BDA, enquanto que, para *A. bisporus*, foram utilizados fragmentos de um basidiocarpo sadio produzido de acordo com as técnicas de cultivo convencionais.

As amostras foram imersas em solução fixativa (solução Karnovsky's modificada), em pH 7,2 e armazenadas a 4°C por 24h. Após este período, foram lavadas por três vezes em tampão cacodilato e em seguida desidratadas em gradiente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100 % por três vezes por 10 minutos cada etapa). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico, para substituição da acetona por CO₂, para completar a secagem. Os espécimes

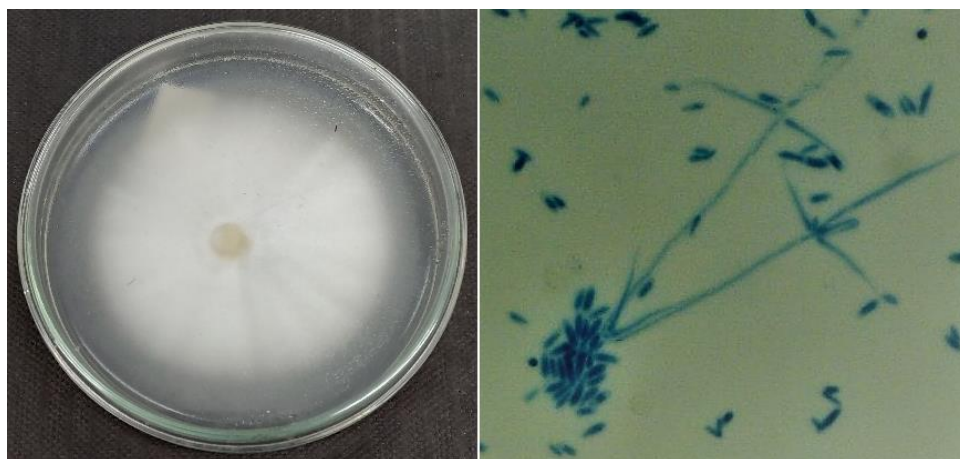
obtidos foram montados em stubs (suportes de alumínio, coberto com uma camada de papel alumínio e fixados com fita de carbono) e cobertos com ouro em evaporador, para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40.

RESULTADOS

Análise da ultraestrutura por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

O agente causal da doença da bolha seca (dry bubble) foi identificado, a princípio, como *Verticillium fungicola*, de modo que muitos trabalhos usam essa nomenclatura (BERNARDO et al., 2004). Posteriormente, a espécie foi renomeada como *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare e Gams [sinônimo: *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk, *Verticillium malthousei* (Preuss) Ware], com base em estudos morfológicos e moleculares (ZARE e GAMS, 2008; BERENDSEN et al. 2010). Conforme demonstrado na Figura 1, o fungo apresenta colônia de aspecto branco, algodinoso, conforme descrito na literatura. Nas observações ao microscópio óptico (40x), foi possível observar conidióforos, conídios e as fiálides, e outras estruturas que são características da espécie.

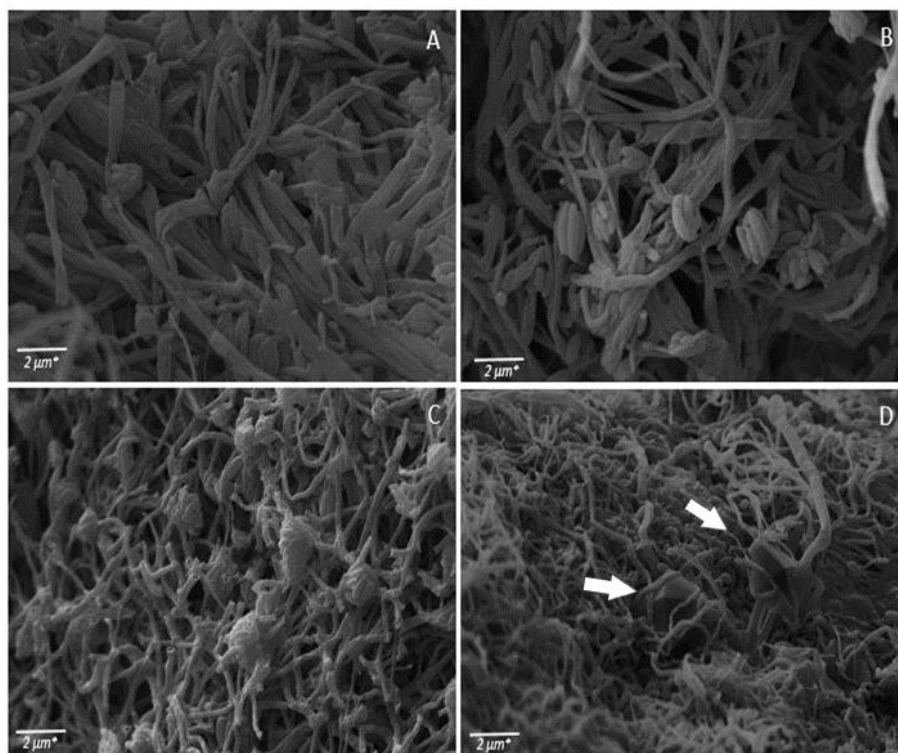
Figura 1. Fotografia de colônia de *L. fungicola* em meio BDA e fotomicrografia das estruturas morfológicas em microscópio óptico (40x).



Fonte: Autores (2020).

Cepas de diferentes linhagens de *L. fungicola* foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura. Em todas as amostras, foi possível observar formação dos conidióforos, fiálides e agregados de conídios. Foram avaliadas três cepas distintas, mas apenas na cepa LTL03 foi possível observar a presença de cristais, como evidenciado na Figura 2.

Figura 2 - Eletromicrografia de varredura de diferentes cepas de *L. fungicola*. (A): Cepa LTL02. (B): Cepa LTL01. (C): Cepa LTL03 e presença de cristais envolvidos pelas hifas (D).



Fonte: Autores (2020).

Analisando as imagens obtidas através do microscópio eletrônico de varredura, observa-se semelhanças entre as três cepas, sendo possível observar a forma e estrutura dos conídios. O que recebe destaque é a presença de cristais produzidos pela cepa LTL03. A presença de cristais em *L. fungicola* foi anteriormente observada por Zare e Gams (2008). Nunes et al. (2017) relataram que o cristal é constituído por cálcio, confirmando se tratar de oxalato de cálcio, sugerindo que os cristais são produzidos como parte do metabolismo do fungo.

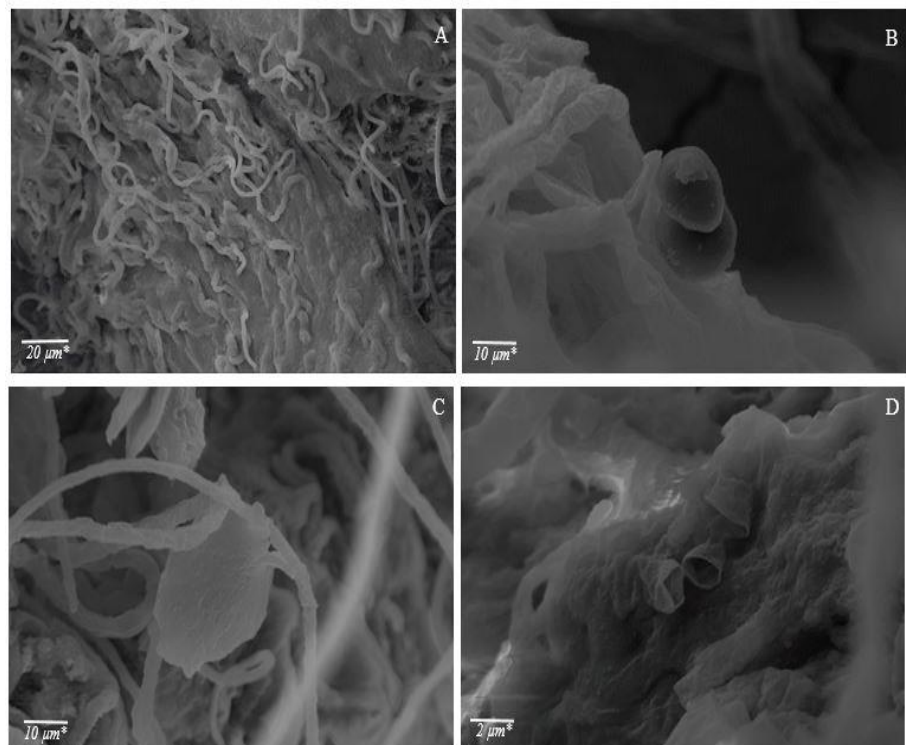
Para as análises de MEV nas amostras de *A. bisporus*, esperava-se observar as estruturas do “tecido” que forma o cogumelo sadio (Figura 3), bem como possíveis deformações e desestruturação desse material. Os resultados dessa análise estão demonstrados na Figura 4, onde é possível observar hifas normais, bem como hifas com sinais de desintegração. A desintegração das hifas pode ocorrer em função de diferentes fatores, dentre eles, a ação de outros microrganismos (ZIVANOVIC et al., 2000). Esses resultados demonstram que a MEV é uma ferramenta adequada para o estudo da interação entre *L. fungicola* e basidiocarpos de *A. bisporus*, uma vez que a técnica permite uma distinção entre hifas normais e hifas afetadas pela ação do patógeno.

Figura 3. Fotografia cultivo de cogumelo champignon (*Agaricus bisporus*).



Fonte: Autores (2020).

Figura 4 - Eletromicrografia de varredura de *Agaricus bisporus*: (A-C): Hifas e estruturas normais. (D). Hifas apresentando sinais de desintegração.



Fonte: Autores (2020).

A doença da bolha seca caracteriza-se por apresentar sintomas típicos no corpo de frutificação, os quais dependem do momento em que ocorre a infecção. Como sintomas mais leves, surgem manchas marrons sobre o píleo, as quais, apesar de depreciar o produto, não impedem a sua comercialização, dependendo do número e da intensidade das mesmas. Entretanto, sintomas mais severos podem ocorrer, levando a uma completa deformação do cogumelo, inviabilizando a sua comercialização.

Portanto, para futuros estudos buscando técnicas de controle da doença, será importante avaliar a evolução da doença em função dos tratamentos. Por isso, a utilização de ferramentas adequadas será muito importante, não apenas para os objetivos diretos de controle, mas também para se conhecer melhor o processo. Para isso, será importante avaliar basidiocarpos apresentando sintomas da doença em diferentes estádios da mesma.

CONCLUSÕES

A espécie *L. fungicola* pode ser facilmente identificada pelas características morfológicas macroscópicas da colônia em placa, associadas às características microscópicas ao microscópio ótico, onde as estruturas reprodutivas assexuadas típicas são facilmente observadas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser importante para a observação de cristais, os quais são apresentados como uma característica da espécie. Além disso, a MEV é uma técnica adequada para o estudo do efeito de fatores bióticos sobre as hifas que formam o basidiocarpo de *A. bisporus*.

Microscopy as a tool to study the pathogen *Lecanicillium fungicola* and its effect on the mushroom *Agaricus bisporus*

ABSTRACT

The button mushroom *Agaricus bisporus* is known in Brazil as champignon de Paris, being still the most cultivated mushroom in the country. One of the main diseases that affect this mushroom is dry bubble disease, caused by the fungus *Lecanicillium fungicola*. Despite this, it is a disease that has not yet been studied in Brazil and there are no effective control measures. The objective of this study was to evaluate the use of microscopy as a tool to study the interaction between these two fungi (*A. bisporus* and *L. fungicola*). The asexual reproductive structures of the pathogen are easily observed by optical microscopy, facilitating its identification. Scanning electron microscopy is a tool of great potential because it allows visualizing the interaction between the hyphae of the pathogen and the mushroom tissue. This tool will be very important in future studies to establish methods of controlling the pathogen, based on the damage it can cause on the mushroom tissue.

KEYWORDS: button mushroom, dry bubble disease, SEM

REFERÊNCIAS

BERENDSEN, R.L., BAARS, J.J.P., KALKHOVE, S.I.C., LUGONES, L.G., WÖSTEN, H.A.B., BAKKER, P.A.H.M. "***Lecanicillium fungicola*: Causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom.**" Mol. Plant Pathol. 11, 585–595. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00627.x>

BERNARDO, D., CABO, A.P., NOVAES-LEDIEU, M., MENDOZA, C.G. "***Verticillium* disease or "dry bubble" of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan.**" Can. J. Microbiol. 50, 729–35. 2004. <https://doi.org/10.1139/w04-047>

MILES, P. G.; CHANG, S.T. "**Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**". CRC press, 2004.

GEA, F.J., NAVARRO, M.J. "**Mushroom Diseases and Control, in: Edible and Medicinal Mushrooms.**" John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 239–259. 2017. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch12>

NUNES, J.S., ROCHA B., M., ZIED, D.C., LEITE, A.G., DIAS E.S., ALVES, E. "**Evaluation of the infection process by *Lecanicillium fungicola* in *Agaricus bisporus* by scanning electron microscopy.**" Rev. Iberoam. Micol. 34, 36–42. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.04.006>

ZARE, R., GAMS, W. "**A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*.**" Mycol. Res. 112, 811–824. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.019>

ZIVANOVIC, S., BUSHER, R.W., KIM, K.S. "Textural changes in mushrooms (*Agaricus bisporus*) associated with tissue ultrastructure and composition." J. Food Sci. 65, 1404–1408. 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10621>

Recebido: 2020-05-11

Aprovado: 2020-08-23.

DOI: 103895/recit. V12n29.12260

Como citar: LEE, LT; MORAES, T.S.J; CASTRO, C.P.C.; DIAS, E. S., Avaliação da utilização de microscopia como ferramenta de identificação dos fungos *Lecanicillium fungicola* e *Agaricus bisporus* R. Eletr. Cient. Inov. Tecnol, Medianeira, v. 12, n. 29, p. 1- 9, jan/abr, 2021 Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/recit>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Lundoi Tobias Lee

Universidade Federal de Lavras Caixa Postal 3037 - CEP: 37200-900 - Lavras/MG]

Direito autorial: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/ Internacional.



