

DETECÇÃO DA *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* POR REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) DEPOIS DO TRATAMENTO DOS GRÃOS DE SOJA POR FEIXES DE ELÉTRONS

G. B. Fanaro, S. Aquino, R. L. Guedes, R. G. Crede, I. T. Sabundjian, M. O. Ruiz, A.L.C.H.Villavicencio*

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. Centro de Tecnologia das Radiações
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária
CEP: 05508-910, São Paulo, Brazil.
villavic@ipen.br

RESUMO

O Brasil atualmente como o maior exportador de soja no mundo tem sofrido conseqüências com a contaminação dessa cultura pelo fungo da ferrugem asiática sendo prejudicada desde a plantação até a colheita com perdas que variam de 10-80%. Por ser uma doença nova nas Américas, não se tem ainda espécie resistente ao seu ataque. Esta contaminação prejudica as exportações para os países que não querem ter suas culturas contaminadas, afetando assim o comércio internacional com os países que o Brasil comercializa. A ferrugem asiática é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* e sua disseminação é de difícil controle, pois ocorre através da dispersão pelo vento. O fungo *P. pachyrhizi* é de origem asiática e foi encontrado recentemente na África do Sul, Paraguai, Argentina e Brasil. Uma alternativa para minimizar as perdas é preservando os grãos através da irradiação, o uso de acelerador de elétrons é indicado, pois sua vantagem para a indústria exportadora de grãos é fundamental. Além de poder ser desligado quando não estiver em uso, a fonte não precisa ser recarregada, é facilmente disponível, possui alta taxa de dose e baixa energia em nosso caso, agilizando o processo e reduzindo custos com a logística. Este trabalho tem o objetivo de identificar, por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a presença do fungo *P. pachyrhizi* em grãos de soja irradiados, nas doses de 1 e 2kGy, no IPEN-CNEN no acelerador de elétrons - Radiation Dynamics (Radiation Dynamics Co. modelo JOB, New York, USA), 1,5 MeV-25mA com a energia de 1,5 MeV.

1. INTRODUÇÃO

A soja é a cultura de grãos mais importante do Brasil, que é o maior exportador mundial desse produto, gerando renda de bilhões de dólares, direta e indiretamente [1,2]. Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos, estão as doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus que, em geral, são de difícil controle. A principal doença da soja no momento é a ferrugem asiática [1,3].

A ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e foi identificada pela primeira vez no continente americano em março de 2001, no Paraguai. Em maio, foi constatada também no estado do Paraná. Na safra 2001/2002, a doença voltou a ocorrer em todo o Paraguai e foi encontrada também na Argentina, Bolívia e nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás. Nos locais mais atingidos, as reduções de rendimento de grãos foram estimadas entre 10% e 80% [2-10].

O *P.pachyrhizi* é altamente dependente de umidade, necessitando de, pelo menos, seis horas de umidade livre, para que se inicie a contaminação. Temperatura amena é ideal, mas não limitante, uma vez que a doença pode se estabelecer entre 15°C e 30°C [4,10]. Sua

disseminação é de difícil controle, pois é feita pela dispersão de seus uredosporos através do ar [2,5,10].

O fungo produz nas plantas lesões com extensivas áreas necróticas e com nenhum ou apenas um ou dois soros uredinais causando crestamento foliar de cor castanho avermelhada (chamado de RB). As populações de *Phakopsora* provenientes da Ásia produzem lesões com mais de dois soros uredinais, sem áreas necróticas, provocando um escurecimento da folha de cor castanho claro (chamado de TAN) [1,11]. Por ser biotrófico, as células infectadas pelo fungo morrem somente após ter ocorrido abundante esporulação. Devido a isso, as lesões não são facilmente visíveis no início da infecção [5,11,12].

A infecção por *P. pachyrhizi* causa rápido escurecimento e queda prematura das folhas, impedindo a plena formação dos grãos. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e maior a perda do rendimento e da qualidade [3,4,6,12,13].

Em casos mais severos, quando a doença atinge a soja na fase de formação das vagens ou no início da granação, ela pode causar o aborto e a queda das vagens, resultando em até perda total do rendimento. No Brasil, os danos mais severos foram observados em Goiás e no Mato Grosso do Sul [12].

O controle da ferrugem da soja compreende diversas medidas conjuntas. Quando a doença já está ocorrendo, a utilização de fungicidas é o principal método de controle de oídio e do complexo de doenças de final de ciclo é prática recomendada onde as doenças ocorrem, sendo a maioria dos fungicidas registrados para cultura da soja pertencentes aos grupos dos triazóis, estrobilurinas e benzimidazóis [3,6].

A ferrugem é uma doença imprevisível, cuja ocorrência inicial e a maior ou menor severidade dependem das condições climáticas e da proximidade da fonte do inócuo e, portanto, podem variar significativamente de um ano para outro. Assim, é fundamental que os produtores e os técnicos da assistência estejam continuamente atentos, realizando o monitoramento das lavouras para a detecção dos primeiros sintomas [10].

Um processo alternativo para minimizar as perdas é o tratamento dos grãos por radiação ionizante. O uso de aceleradores de elétrons é indicado, pois sua vantagem para a indústria exportadora de grãos é fundamental. Ele pode ser instalado em portos e irradiar os grãos antes de embarcarem, diminuindo custos com logística [2].

A radiação ionizante, quando absorvida por um material biológico, pode ter ação direta ou indireta sobre o material que recebeu esse processo. O mecanismo primário pelo qual a radiação destrói os microrganismos é dado pela quebra das fitas duplas de DNA, causando a inativação dessa célula. Esse processo é dominante quando esporos secos de microrganismos são irradiados [14-20].

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que tem tido um constante crescimento em laboratórios de diagnóstico, o que permite a identificação de vários patógenos em diferentes tipos de alimentos [21]. Por ser um método extremamente específico, a análise de microrganismos presentes nos alimentos pela PCR amplifica apenas o DNA desejado, não importando quantos tipos de materiais genéticos diferentes o alimento tem. Nesse processo, tal DNA pode ser detectado muito bem em células não cultiváveis. Isso

se dá através de dois iniciadores (“primers”) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado [22].

2. OBJETIVOS

Verificar a presença de *Phakopsora pachyrhizi* através do método da PCR nas diferentes amostras utilizadas.

Avaliar as diferentes doses de radiação provenientes de aceleradores de elétrons para inibir a disseminação dos esporos do fungo causador da ferrugem na soja após a colheita.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Grãos de Soja

Os grãos de soja foram fornecidos por uma empresa que exporta grãos e também os utiliza como matéria prima para a fabricação de seus produtos. Estes grãos foram escolhidos ao acaso, colocados em sacos plásticos em triplicata com 500g cada, selados e submetidos ao processamento por radiação.

3.2. Fungo

Amostra de soja naturalmente contaminada com *P. pachyrhizi* foi fornecida pela mesma empresa.

3.3. Primers

Os primers foram confeccionados através da seqüência:

Ppa1	5' TTA GAT CTT TGG GCA ATG GT 3'	332bp
Ppa2	5' GCA ACA CTC AAA ATC CAA CAA T 3'	

3.4. Irradiação

As amostras de soja foram embaladas em sacos plásticos (triplicata), seladas (500 gramas por amostra) e irradiadas nas doses de 1 e 2 kGy. A amostra controle conteve a mesma quantidade de grãos, foi embalada da mesma forma e armazenada até ser utilizada na técnica de semeadura direta.

Foi utilizado um irradiador tipo Acelerador de elétrons da Radiation Dynamics Inc. USA, 1,5 MeV-25mA com a energia de 1,5 MeV. Por causa da espessura dos grãos, a amostra foi virada, para que a radiação atinja todos os lados. A dosimetria foi feita utilizando-se o sistema dosimétrico de filmes de triacetato de celulose, calibrado e com rastreabilidade IDAS (International Dose Assurance Service). A taxa de dose do acelerador foi de 2,23kGy/s.

3.5. Semeadura Direta

Foram utilizadas três placas de Petri para cada amostra. Foram colocados 4 grãos com o auxílio de uma pinça, em cada placa, contendo Ágar Sabouraud. Os grãos não foram distribuídos muito próximos um do outro, pois isto dificultaria a leitura das placas. As placas foram para a incubadora, sem inverter, a 25°C durante aproximadamente 5 dias. Após esse período foi observado se ocorreu o crescimento de colônias [23]. As placas foram identificadas com a data da realização deste experimento.

3.6. Extração de DNA

A extração do DNA do fungo seguiu o seguinte protocolo: foi adicionado 10 g de amostra em 100 ml meio de cultura (caldo Sabouraud); depois incubado por 5 dias à temperatura de 25°C; homogeneizado o meio de cultura e transferido 1 ml a um tubo de 2 ml; em seguida foi centrifugado a 5.000g por 10 min; então foi descartado o sobrenadante; acrescentado 1 ml do tampão (0,60g de 100 mM Tris, 0,37 de 20 mM Na₂-EDTA , 4,1g de 1.4 M NaCl, 1g de 20 g/l CTAB; ajustado o pH para 8.0) no precipitado; centrifugado por 10 min a 10.000 g (rcf) a 25°C; removido o sobrenadante completamente virando o tubo uma única vez de boca para baixo por 30 min - 1 h sobre um papel absorvente; adicionado 500 µL de etanol a 70% e misturado; centrifugado por 10 min a 10.000 g (rcf) a 25°C; removido o sobrenadante completamente e dissolvido o DNA em 50 µL de água bidestilada e armazenado a -20°C.

3.7. PCR

A PCR foi feita num volume final de 25µL (23µL de mastermix + 2µL de amostra). O mastermix foi preparado com: 12,3µL de água bidestilada, 2,5µL de Buffer (tampão) 10X, 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1,5µL dNTP's (2,5mM), 2,5µL de cada primer (10µM) e 0,2µL de Taq polimerase termoestável (5U/µL).

Essa solução após pronta foi levada ao Termociclador Mastercycle da **Eppendorf** com o seguinte programa: Pré incubação à 94°C por 5 minutos, desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento à 55°C por 1 minuto e alongamento à 72°C por 2 minutos, consistindo um total de 35 ciclos (desnaturação, anelamento e alongamento); seguido de um alongamento final à 72°C por 7 minutos.

3.8. Eletroforese em Gel

No gel de agarose foi colocado um volume de 12µl (10µL amostra + 2µL de azul de bromofenol [Para 6mL foi pesado 0,025g de azul de bromofenol e diluído em TBE 0,045M e adicionado 40mL de glicerol]). Estes foram misturados e colocados dentro do gel de agarose, em uma tensão constante de (70V). Em seguida, o gel foi fotografado através do Sistema Vilber Lourmat Imager .

3.8.1 Gel

Foi pesado 1,2g de agarose e adicionado 60mL de TBE 0,045M (diluição de 1/10 de TBE 0,45M [54g de 0,45M Tris; 27,5g de 0,45M Ácido Bórico; 20ml de 0,1M EDTA {0,744g de Na₂EDTA.2H₂O e completado com 18ml de água}, pH 8,0 e completado com 1000ml e

acertado o pH para 8,4]e levado ao microondas por 1 minuto e 30 segundos na potência máxima; em seguida foi adicionado 3µL de Brometo de Etídio (10mg/mL)

4. RESULTADOS

Ao analisar os resultados nas placas de Petri, foi possível constatar que as doses escolhidas de 1 e 2kGy não foram suficientes para inibir o desenvolvimento das várias colônias de fungos presentes nos grãos de soja, onde o crescimento, nas placas, mostrou-se praticamente igual à placa controle (figura 1).

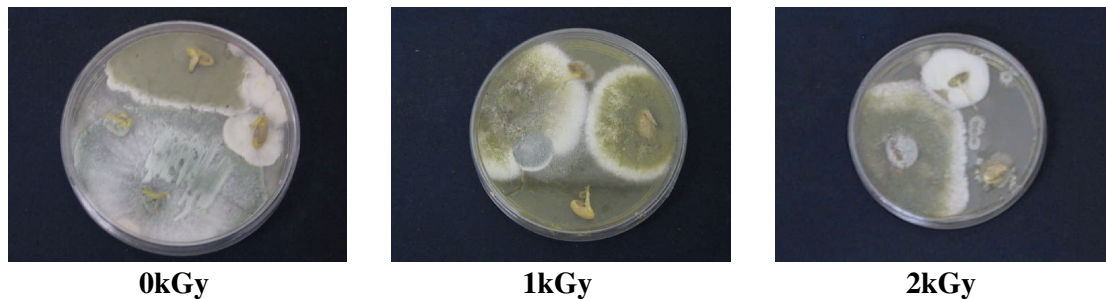


Figura 1. Crescimento de colônias de fungo em placas de petri.

A PCR foi realizada para comprovar a presença de DNA de *P.pachyrhizi* desde o controle, até a dose máxima utilizada nesse trabalho (figura 2).

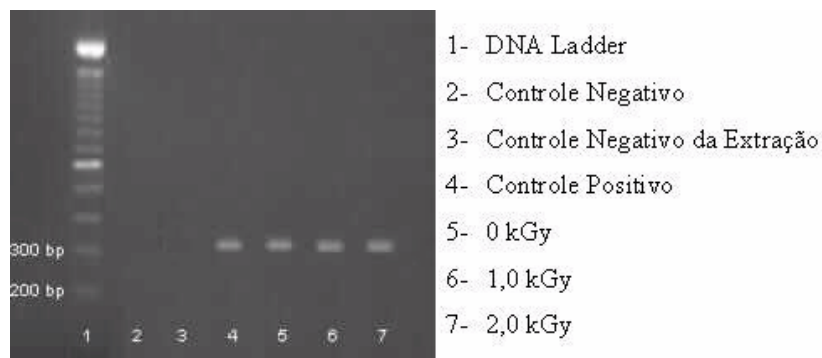


Figura 2. Gel de agarose mostrando a presença de DNA de *Phakopsora pachyrhizi*.

5. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que as doses de 1 e 2kGy, não foram suficientes para inibir o crescimento de colônias de fungos em grãos de soja necessitando então de pesquisas com doses superiores.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a **FAPESP** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS

1. A. A. Carvalho Jr, M. B. Figueiredo, “A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil”, *Summa Phytopathologica*, **Vol.26**, pp. 197-200 (2000).
2. G. B. Fanaro, R. L. Guedes, R. G. Crede, I. T. Sabundjian, T. B. Claudio, J. G. Baldasso, R. Greiner, A. L. C. H. Villavicencio, “Detection of *Phakopsora pachyrhizi* by Polymerase chain reaction (PCR) after E-Beam processim to preserve Soya beans”, *In: EFFoST- Food Innovations for an Expanding Europe, Poster abstracts*. Warsaw, Polônia, p.2.29 (2004).
3. R. M. Soares, S. A. L. Rubin, A. P. Wielewicki, J. G. Ozelame, “Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja”, *Ciência rural, Santa Maria*, **Vol. 34**, n. 4, pp. 1245-1247 (2004).
4. “Comunicado Técnico 96 on line”, <http://www.embrapa.com.br> (2005).
5. “Embrapa”, <http://www.embrapa.com.br> (2005).
6. C. V. Godoy, M. G. Canteri, “Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação”, *Fitopatologia brasileira*, **Vol 29**, pp. 97-101 (2004).
7. Reunião de pesquisa de soja da região Sul, 30, *Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2002/2003*, FUNDACEP/FECOTRIGO, Cruz Alta (2002).
8. J. T. Yorinori, “Ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): ocorrência no Brasil e estratégias de manejo”. *In. II Encontro Brasileiro sobre Doenças da Cultura da Soja. Resumos de palestras*, Passo Fundo, pp.47-54 (2002).
9. J. T. Yorinori, W. P. Morel, R. D. Frederick, L. M. Costamilan, P. F. Bertagnolli, “Epidemia de ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, em 2001 e 2002”, *Fitopatologia Brasileira*, **Vol.27**, pp.S178 (2002).
10. J. T. Yorinori, J. J. Lazzarotto, *Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul*, Embrapa, Londrina (2004).
11. K. R. Bromfield, J. S. Melching, C. H. Kingsolver, “Virulence and aggressiveness of *Phakopsora pcachyrhizi* isolates causing soybean rust”, *Phytopathology*. **Vol. 70**, pp. 17-21 (1980).
12. “Embrapa”, <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/doenca.htm> (2004).
13. L. M. Constamilan, P. F. Bertagnolli, J. T. Yorinori, “Avaliação de danos em soja causados por ferrugem asiática”. *In: Reunião de pesquisa de soja da região Sul, 30 Atas e resumos*, FUNDACEP, Cruz Alta, p. 99 (2002).
14. S. Aquino, “Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente”, *Dissertação (mestrado)* – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) associada com a Universidade de São Paulo (2003).
15. Brasil. “Regulamento técnico para irradiação de alimentos”. *Resolução – RDC nº21*, de 26 de janeiro de 2001.
16. J. F. Diehl, *Safety of irradiated foods*, Marcel Deckker, New York (1995).

17. D. J. Hayes, E. A. Murano, P. S. Murano, D. G. Olson, S. G. Sapp, *Food Irradiation: A Sourcebook*. 1ed., Ames (1995).
18. J. D. Monk, L. R. Beuchat, M. P. Doyle, "Irradiation inactivation of food-borne microorganisms", *Journal of Food Protection*, **Vol.58**, n.2, pp. 197-208 (1995).
19. M. Morehouse, "Food irradiation: the treatment of foods with ionizing radiation", *Food Testing & Analysis*, **Vol.4**, n.3, p.9 (1998).
20. G. L. Tritsch, "Food irradiation", *Nutrition*. **Vol.16**, n.7/8, pp. 698-701 (2000)
21. L. R. Santos, V. P. Nascimento, S. D. Oliveira, M. L. Flores, A. P. Pontes, M. Satin, *Food Irradiation: A guidebook*. Technomic Publishing Company, (1993).
22. U. Candrian, "Polymerase chain reaction in food microbiology". *Journal of Microbiological Methods*. **Vol. 23**, pp. 89 – 103 (1995).
23. J. I. Pitt, A. D. Hocking, *Fungi and Food Spoilage*. 2. ed., Blackie Academic & Professional, London (1997).