

# Comunicado 176

---

## Técnico

ISSN 9192-0099  
Agosto, 2008  
Brasília, DF



### TÉCNICA MODIFICADA DE MICROCULTURA DE FUNGOS PARA VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA

MARTINS, A.<sup>1</sup>

BRAÚNA, L.M.<sup>2</sup>

MARTINS, I.<sup>3</sup>

MELLO, S.C.M.<sup>4</sup>

O gênero *Trichoderma* inclui espécies de grande eficiência como agentes de controle biológico de fitopatógenos principalmente de solos, em todo o mundo. Apesar de sua evidente importância, a taxonomia desse fungo não está totalmente elucidada (1), somando a isso a dificuldade de obtenção de lâminas que permitam uma clara visualização de suas estruturas, dificultando a sua identificação. Com objetivo de facilitar a visualização por microscopia ótica das estruturas de espécies do gênero *Trichoderma*, foi realizada uma modificação na técnica de microcultura (2).

Para os experimentos utilizou-se o meio de cultura BDA (Batata - Dextrose - Agar), e o isolado CEN 162 (*Trichoderma asperellum*) da Coleção de culturas de fungos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e de Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Foram testados quatro métodos, em diferentes períodos de cultivo e luminosidade. O primeiro método foi feito segundo Alfenas (2), e consistiu em forrar placas de Petri com papel toalha umedecido e, sobre este, duas lâminas sobre suportes confeccionados com arame. Foram pipetados 100µL do meio de cultura na superfície das lâminas de vidro, em cada uma de suas extremidades. Sobre essa base formada pelo meio BDA solidificado, depositaram-se, opostamente, duas gotículas da suspensão fúngica à concentração de 10<sup>9</sup> esporo/mL. As gotas foram recobertas por laminulas, permitindo dessa forma o crescimento do fungo em contato com estas. As placas de Petri assim preparadas foram vedadas com filme de PVC e incubadas em câmara de crescimento (B.O.D.) a 25° C.

---

<sup>1</sup> Estudante de Agronomia, Universidade de Brasília, 70919-900, Brasília – DF.

<sup>2</sup> Bióloga, MSc. em Agronomia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70770-900, Brasília - DF

<sup>3</sup> Bióloga, MSc. em Agronomia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70770-900, Brasília - DF.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70770-900, Brasília - DF. \*e-mail: smello@cenargen.embrapa.br

A única diferença da segunda metodologia para a primeira foi no procedimento de inoculação, pois neste caso foi feito uma fenda no meio de cultura já solidificado, utilizando-se uma haste metálica quente, e nesse corte foi depositada a gotícula da suspensão de esporos do fungo. O terceiro e o quarto se diferenciaram entre si da mesma forma que os dois primeiros métodos se diferenciaram, respectivamente. O que diferenciou o primeiro e segundo do terceiro e do quarto método foi que, nesse dois últimos, houve aplicação de uma película de BDA em uma das faces das lamínulas, de forma homogênea, utilizando uma pipeta automática, quando o meio de cultura em estado líquido, encontrava-se ainda em alta temperatura (acima de 40°C), para permitir melhor espalhamento. Os quatro métodos foram testados em quatro diferentes tempos de cultivo, sendo: 48 hs; 72 hs; 96 hs e 120 hs. Também foram utilizados dois tratamentos luminosos, um com fotoperíodo de 12:12 (luz; escuro), outro sem fotoperíodo, ou seja, totalmente na escuridão. Esses tratamentos luminosos foram realizados em todos os quatro métodos nos diferentes tempos de cultivo.

No preparo das lâminas para visualização microscópica, o procedimento foi igual para todos os métodos. Uma gota do corante azul-de-algodão foi depositada sobre uma lâmina de vidro limpa, em seguida retirou-se uma das lamínulas de um dos meios de cultura, com o fungo já crescido, e essa foi colocada sobre a gota, de forma que as estruturas fúngicas aderidas à lamínula ficassem em contato com o corante. Para selagem das lamínulas utilizou-se um esmalte, assim possibilitando uma posterior

visualização microscópica e foto-documentação.

Os dois últimos métodos foram as que produziram os melhores resultados, devido à utilização de uma película de BDA nas lamínulas, possibilitando adesão do fungo, e assim favorecendo melhor visualização microscópica tanto em qualidade como quantitativamente. Também as repetições feitas no escuro, ao proporcionarem crescimento menos adensado e amadurecimento mais lento das estruturas fúngicas, permitiram melhor discriminação das estruturas. Os melhores períodos de incubação foram os de 48 e 72 horas, embora este possa variar de acordo com a espécie e até mesmo entre isolados da mesma espécie. Os melhores resultados alcançados encontram-se ilustrados nas Figuras (1 a 6) obtidas com auxílio de uma câmara digital Axiophot (Zeiss).

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 1.ed. Viçosa: UFV, 2007. 382 p.

KUHLS, K.; LIECKFELDT E.; SAMUELS, G. J.; MEYER, W.; KUBICEK, C. P.; BÖRNER, T. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Mycologia**, New York, v. 89, p. 442-460, 1997.

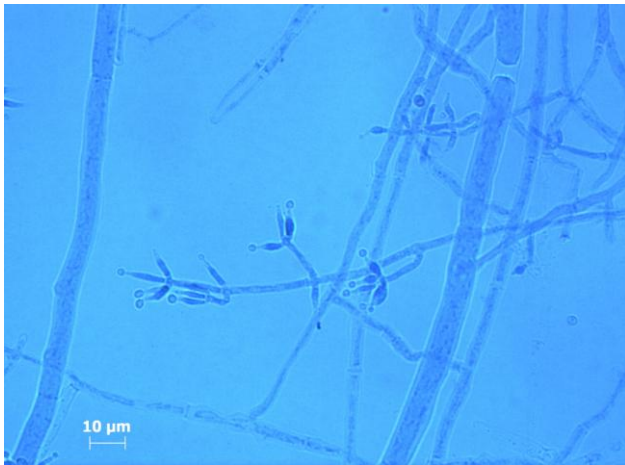


Figura 1 – Fotografia mostrando conidióforos e conídios, 3º método

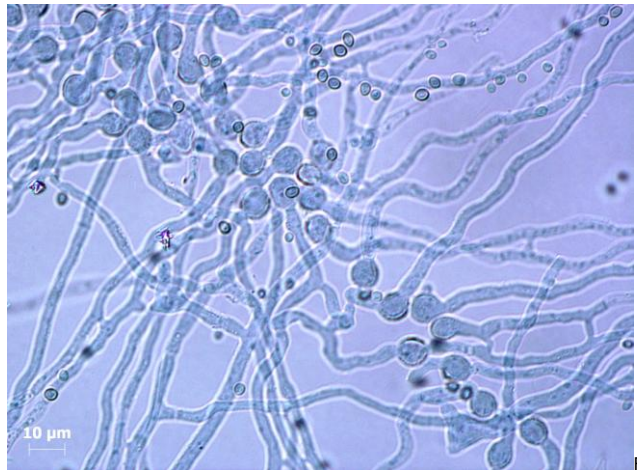


Figura 2 – Fotografia mostrando clamidósporos, 3º método.



Figure 3 - Fotografia mostrando conidióforos e conídios 4º método

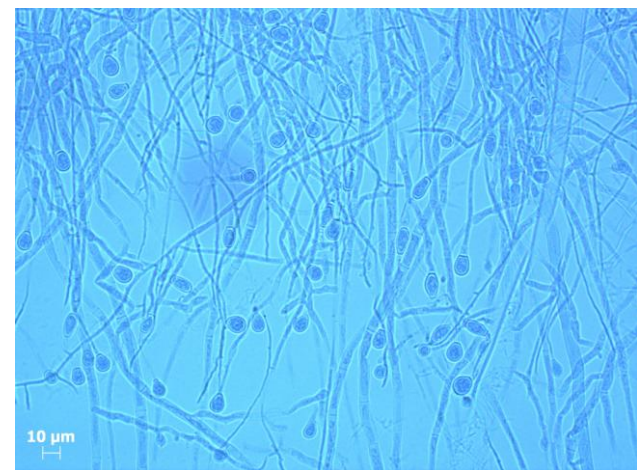


Figura 4 – Fotografia mostrando clamidósporos, 4º método.

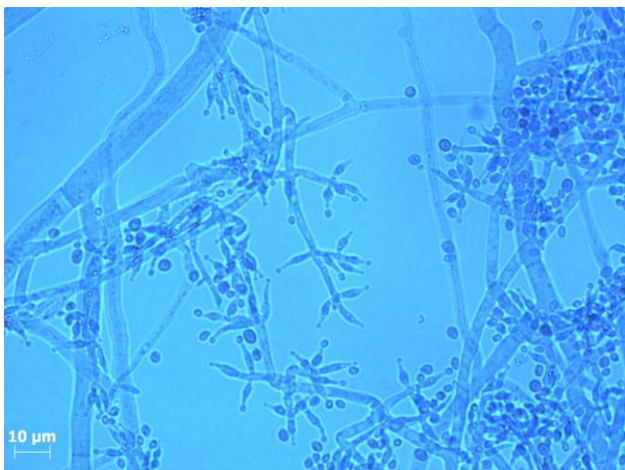


Figura 5 – Fotografia mostrando conidióforo e conídios, 4º método.

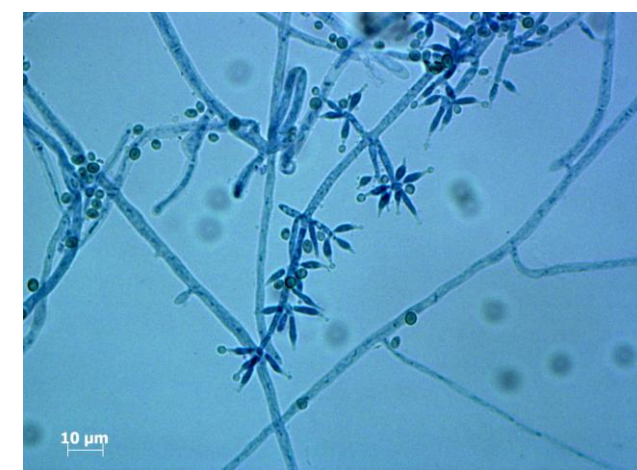


Figura 6 – Fotografia mostrando conidióforos e conídios, 3º método.

**Comunicado  
Técnico, 176**

**Ministério da  
Agricultura,  
Pecuária  
e  
Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2008):

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



**Comitê de  
Publicações**

**Presidente:** Sergio Mauro Folle

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** Arthur da Silva Mariente

Maria da Graça S. P. Negrão

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi  
Carneiro

Sueli Correa Marques de  
Mello

Vera Tavares de Campos  
Carneiro

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Ligia Sardinha Fortes*

**Editoração eletrônica:** Maria da Graça  
S.P. Negrão

**Expediente**