

Autores

Leonardo Minaré Braúna
Biólogo, Mestrando,
Bolsista
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia
leonardo@cenargen.
embrapa.br

Irene Martins
Agrônoma, M.Sc.
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia
irene@cenargen.embrapa.br

João Batista Tavares
Biólogo, Ph.D.
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia
jtavares@cenargen.
embrapa.br

Sueli Corrêa Marques de Mello
Engenheira Agrônoma, Ph.D.
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia
smello@cenargen.
embrapa.br

Efeito de quatro diferentes métodos de preservação sobre o crescimento e a viabilidade de fungos agentes de controle biológico

Introdução

As coleções de culturas de micro-organismos, em sua forma mais abrangente, são centros de conservação de recursos genéticos *ex-situ*, que têm como principais funções a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de micro-organismos para serem utilizados em programas de interesse da sociedade e para garantir às gerações futuras o acesso a esse capital biológico. Assim, em função das atividades de rotina, dados de pesquisa e informações sobre o acervo das coleções são gerados e utilizados em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais biológicos. Desse modo, a manutenção das características biológicas do material conservado é de vital importância.

Conhecer a biodiversidade e a história natural dos fungos contribui diretamente para o conhecimento da biota terrestre, e tal conhecimento é a base sobre a qual podem se iniciar estratégias de proteção e utilização sustentável dos recursos naturais (ROSSMAN et al., 1998). Jasen e Hallwachs (1994) constataram que, antes de qualquer estratégia de proteção ou abordagem econômica de algum recurso, é necessário conhecer o que existe, ou seja, fazer um inventário. Esta situação é particularmente importante no caso dos fungos, considerando o enorme significado econômico que eles possuem (TEN KATE e LAIRD, 1999).

Os fungos constituem um grupo numeroso e filogeneticamente bastante diversificado de organismos. Por terem um poderoso aparato enzimático, participam ativamente da reciclagem de resíduos vegetais, decompondo-os por meio de sua ação celulítica e lignolítica. Além desta atividade saprofitica, os fungos podem também viver em associação simbiótica com as plantas, proporcionando a elas melhores condições de desenvolvimento em ambientes adversos, mediante associações micorrízicas (KRUGNER e BACCHI, 1995). Fungos representam, ainda, uma variada fonte de compostos bioquímicos, incluindo diversos antibióticos, com grande potencial para o controle biológico de pragas e doenças (ALEXOPOULOS et al. 1996; FOSTER, 1949; HAWKER, 1957) e para a elaboração de produtos farmacêuticos (CARVALHO et al, 1998).

Portanto, o material biológico conservado por métodos adequados em coleções de culturas tem uma ampla gama de aplicações na agropecuária, na indústria farmacêutica e na preservação do meio ambiente. A estimativa do mercado global para produtos derivados de recursos genéticos nas áreas de fármacos, fitofármacos, agricultura e outras aplicações biotecnológicas situa-se na faixa de US\$ 500 a 800 bilhões por ano (Brasil, 2002).

As coleções microbiológicas *ex-situ* podem ser classificadas como coleções de trabalho, coleções institucionais ou coleções de serviço. Como infraestrutura fundamental na conservação e na distribuição de recursos genéticos, com a

finalidade de pesquisa e desenvolvimento, as coleções de serviço merecem atenção especial. A primeira coleção de serviço de que se tem registro foi a Coleção Kral, estabelecida em Praga, em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas (CANHOS e VAZOLLER, 2004).

Estas coleções *ex-situ* atuam também como provedores de serviços especializados e centros de informação. Os diferentes tipos de coleções de culturas, incluindo coleções de trabalho, coleções institucionais e, principalmente, coleções de serviço, têm uma importância destacada na conservação e na exploração da diversidade genética e metabólica (CANHOS et al. 1999).

O material biológico certificado é um recurso de alto valor agregado, presente em inúmeros produtos dos mais diversos setores da economia. O acesso de insumos e produtos ao mercado internacional estará sujeito, de forma crescente, a uma complexa legislação, constituindo-se potencialmente em barreiras sanitárias e comerciais. A superação destas barreiras dependerá da criação de uma estrutura de serviços tecnológicos que responda aos procedimentos de avaliação da conformidade e que sejam capazes de fornecer, mediante certificação e formas correlatas, a evidência de que os produtos atendem a requisitos técnicos especificados em normas e regulamentos. As exigências relativas à qualidade dos materiais biológicos para quaisquer fins representam um grande salto na agregação de valor a produtos decorrentes de aplicações industriais, agrícolas e ambientais. Por outro lado, tais exigências demandam significativo investimento na organização da base técnica laboratorial, na formação de quadros técnicos e intermediários e no estabelecimento de logística que garanta a prestação de serviços em ambiente de alta confiabilidade quanto aos quesitos de biossegurança, rastreabilidade, sigilo e proteção patentários (TEN KATE e LAIRD, 1999).

A coleção de culturas de fungos para o controle biológico de fitopatógenos e de plantas daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é classificada como coleção especializada de trabalho, pelo fato de o acervo ser resultante das atividades de pesquisa do Laboratório de Fitopatologia. Esta coleção mantém seus isolados preservados pelos seguintes métodos: água destilada esterilizada

(método Castellani), óleo mineral, temperatura ultrabaixa (-80°C) e nitrogênio líquido (-196°C). A diversidade dos métodos escolhidos para a preservação dos isolados faz-se necessária em função da dificuldade de um método ser abrangente e satisfatório para todos os fungos, já que estes micro-organismos possuem características distintas.

A preservação em água destilada, descrita por Castellani (1939, 1967), consiste em armazenar o fungo crescido em meio de cultura específico para o organismo em questão e submergi-lo em água destilada esterilizada. Figueiredo (1967) e Figueiredo e Pimentel (1975) obtiveram sucesso na viabilidade e patogenicidade de fungos fitopatogênicos utilizando este método.

A preservação em óleo mineral foi utilizada primeiramente por Buell e Weston (1947). De acordo com este método, após o crescimento do fungo em meio de cultura, este é recoberto por uma lamina de 1 cm de óleo mineral para prevenir o meio da desidratação e diminuir a atividade metabólica e o crescimento do fungo, reduzindo, assim, a tensão do oxigênio.

A preservação por temperatura ultrabaixa – apesar de ser um método caro devido ao elevado preço de *freezers* especiais – é utilizada em algumas coleções de cultura, uma vez que pesquisas demonstram que este método possibilita a conservação de micro-organismos por longos períodos (BAKER, 1955; REY, 1977).

A preservação por nitrogênio líquido é chamada de método final na preservação de micro-organismos (SMITH e ONIONS, 1983), pois induz a dormência do organismo, não existindo qualquer mudança fenotípica ou genotípica. Esta preservação é dificultada nos casos em que os organismos não produzem esporos em meio de cultura, o que reforça a necessidade de se preservar as estruturas de resistência quando presentes.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a eficiência e o efeito desses métodos de preservação sobre a capacidade de crescimento, esporulação e variabilidade das características fenotípicas das colônias de 18 isolados de fungos mitosporicos utilizados no controle biológico de fitopatógenos e de plantas daninhas.

Materiais e métodos

Foram selecionados 18 isolados para o teste de crescimento e viabilidade nos quatro métodos utilizados para a conservação, sendo que seis são agentes de controle de plantas daninhas (três de *Cercospora caricis* e três de *Alternaria cassiae*) e os 12 restantes são agentes de controle de fitopatógenos. Quatro desses isolados pertencem à espécie *Dicyma pulvinata*, quatro ao gênero *Gliocladium* e quatro à espécie *Trichoderma harzianum* (Tabela 1).

Após a retirada dos isolados dos referidos sistemas em que se encontravam armazenados, eles foram repicados em placas de petri de nove centímetros de diâmetro contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar

(BDA). Após dois dias, observou-se o crescimento dos isolados e, passados 30 dias da repicagem, eles foram fotografados. Em seguida, foram preparadas lâminas para a visualização de suas estruturas.

Resultados e discussão

Os resultados demonstraram eficiência na preservação dos isolados de *A. cassiae* nos quatro métodos; porém, houve interferência na capacidade de esporulação, principalmente das culturas preservadas sob temperatura ultrabaixa (-80°C).

Para *C. caricis*, os métodos Castellani, óleo mineral e nitrogênio líquido foram eficientes, especialmente o primeiro. Surpreendentemente, o método Castellani favoreceu a esporulação das culturas reativadas em

Tabela 1. Tempo de conservação, em meses, dos 18 isolados testados da coleção de culturas de fungos para o controle de fitopatógenos e de plantas daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Isolado	Código	Tempo de armazenagem em água estéril	Tempo de armazenagem em óleo mineral	Tempo de armazenagem em baixa temperatura (-80°C)	Tempo de armazenagem em nitrogênio líquido (-196°C)
<i>Alternaria cassiae</i>	CEN 023	45 meses	44 meses	47 meses	47 meses
<i>Alternaria cassiae</i>	CEN 028	45 meses	44 meses	47 meses	117 meses
<i>Alternaria cassiae</i>	CEN 029	45 meses	44 meses	47 meses	115 meses
<i>Cercospora caricis</i>	CEN 052	43 meses	44 meses	47 meses	111 meses
<i>Cercospora caricis</i>	CEN 063	43 meses	44 meses	47 meses	108 meses
<i>Cercospora caricis</i>	CEN 080	45 meses	44 meses	47 meses	103 meses
<i>Dicyma pulvinata</i>	CEN 056	45 meses	44 meses	47 meses	60 meses
<i>Dicyma pulvinata</i>	CEN 086	42 meses	41 meses	20 meses	102 meses
<i>Dicyma pulvinata</i>	CEN 099	45 meses	42 meses	45 meses	97 meses
<i>Dicyma pulvinata</i>	CEN 123	42 meses	42 meses	44 meses	97 meses
<i>Gliocladium</i> sp	CEN 175	43 meses	45 meses	44 meses	44 meses
<i>Gliocladium</i> sp	CEN 180	43 meses	45 meses	44 meses	44 meses
<i>Gliocladium</i> sp	CEN 183	43 meses	45 meses	44 meses	44 meses
<i>Gliocladium</i> sp	CEN 212	37 meses	45 meses	39 meses	39 meses
<i>Trichoderma harzianum</i>	CEN 139	48 meses	44 meses	48 meses	48 meses
<i>Trichoderma harzianum</i>	CEN 145	43 meses	44 meses	48 meses	45 meses
<i>Trichoderma</i> sp	CEN 190	35 meses	39 meses	44 meses	42 meses
<i>Trichoderma harzianum</i>	CEN 268	29 meses	29 meses	31 meses	31 meses

BDA, corroborando dados obtidos por Figueiredo (1967) e Figueiredo e Pimentel (1975), os quais lograram sucesso na viabilidade e patogenicidade de fungos fitopatogênicos. Porém, em freezer a -80°C , os isolados não sobreviveram e, nas culturas recuperadas de óleo mineral e nitrogênio líquido, não se observou a produção de esporos.

Para *D. pulvinata*, os quatro métodos foram viáveis, exceto para os isolados CEN 86 e CEN 123, que não sobreviveram quando conservados a -80°C .

Para os isolados de *Gliocladium* spp., os quatro métodos avaliados foram eficientes. Contudo, o isolado CEN 180 não sobreviveu em óleo mineral e, quando recuperado do nitrogênio líquido, apresentou crescimento limitado. Os demais isolados (CEN 175, CEN 183 e CEN 212) apresentaram baixa esporulação quando conservados a -80°C e em nitrogênio líquido.

Para *T. harzianum*, os quatro métodos mostraram-se adequados. Porém, o isolado CEN 139 apresentou crescimento e esporulação limitados em óleo mineral.

Estes resultados ratificam a necessidade de preservação dos micro-organismos em uma variedade de métodos recomendados e descritos, pois refletem, de certa forma, a indisponibilidade até o momento de um método que seja abrangente e satisfatório para todos os fungos, já que estes micro-organismos possuem características distintas.

Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

BAKER, P. R. W. The micro-determination of residual moisture in freeze-dried biological materials. **Journal of Hygiene**, v. 53, p. 426-435, 1955.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Sistema de Avaliação da Conformidade de Material Biológico**. Brasília, SENAI/DN, 2002. 102p. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/Temas/Desenv/MaterialBiologico.pdf>

BUELL, C. B. e WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining

collections of fungus cultures. **American Journal of Botany**, v. 34, p. 555-561, 1947.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. e MANFIO, G. P. Coleções de Culturas de Micro-organismos. In: BRITO, M. C. W. e JOLY, C. A. (Ed.) **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento no final do século XX. Volume 7: Infraestrutura de Conservação in-situ e ex-situ**. São Paulo. FAPESP, 1999. p. 81-101. Disponível em: <http://www.biota.org.br>.

CANHOS, V. P. e VAZOLLER, R. F. **A importância das coleções biológicas**. 2004. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/framereport.htm>.

CARVALHO, M.; AIRES-BARROS, M. e CABRAL, J. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. **EJB Electronic Journal of Biotechnology Universidad Catolica de Valparaiso**, Chile, v. 1, n. 3, 1998. Disponível em <http://www.ejb.org/content/vp14/issue1/full/8/>

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **Biológico**, v. 33, p. 9-13, 1967.

FIGUEIREDO, M. B. e PIMENTEL, C. P. V. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. **Summa Phytopathologica**, v. 50, p. 299-302, 1975.

FOSTER, J. W. **Chemicals Activities of Fungi**. New York: Academic Press, 1949.

HAWKER, L. E. **The Fisiology of Reproduction in Fungi**. Cambridge: University Cambridge, 1957.

JANSEN, D. e HALLWACHS, W. **All Taxa Biodiversity Inventory (ATBI) of Terrestrial Systems. A Generic Protocol for Preparing Wildland Biodiversity for Non-damaging Use**. Philadelphia,

Pennsylvania, 1994. Report of An NSF Workshop, 16-18 April. p.132.

KRÜGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1.

REY, L. R. Glimpses into fundamental aspects of freeze drying. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FREEZE DRYING OF BIOLOGICAL PRODUCTS, 50, 1976, Washington, DC. **Proceedings...** Washington, DC: International Association of Biological Standardization, 1977. p. 19-27. CABASSO, V. J. e REGAMEY, R. H. (Ed.)

ROSSMAN, A.; TULLOS, R.; O´DELL, T. e THORN, R. **Protocols for an All Taxa Biodiversity Inventory of Fungi in a Costa Rica Conservation Area**. Boone, North Carolina: Park Publishers, 1998.

SMITH, D. e ONIONS, A. H. S. **The Preservation and Maintenance of Living Fungi**. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute, 1983.

TEN KATE, K. e LAIRD, S. A. **The commercial use of biodiversity: access to genetic resources and benefit-sharing**. London: Earthscan Publications, 1999.

Circular Técnica, 88

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida W5 Norte; Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil; CEP: 70770-900
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
E-mail: sac@cenargen.embrapa.br
1ª edição
Publicação *on line* (2009)

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê Local de Publicações

Presidente: *Lúcio Brunale*
Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*
Membros: *José Roberto de Alencar Moreira, Diva Maria de Alencar Dusi, Regina Maria Dechechi G. Carneiro, Samuel Rezende Paiva e Jonny Everson Scherwinski Pereira.*
Membros suplentes: *João Batista Tavares da Silva e Margot Alves Nunes Dode.*

Expediente

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*
Normalização bibliográfica: *Lígia Sardinha Fortes*
Editoração eletrônica: *Cíntia Pereira da Silva*