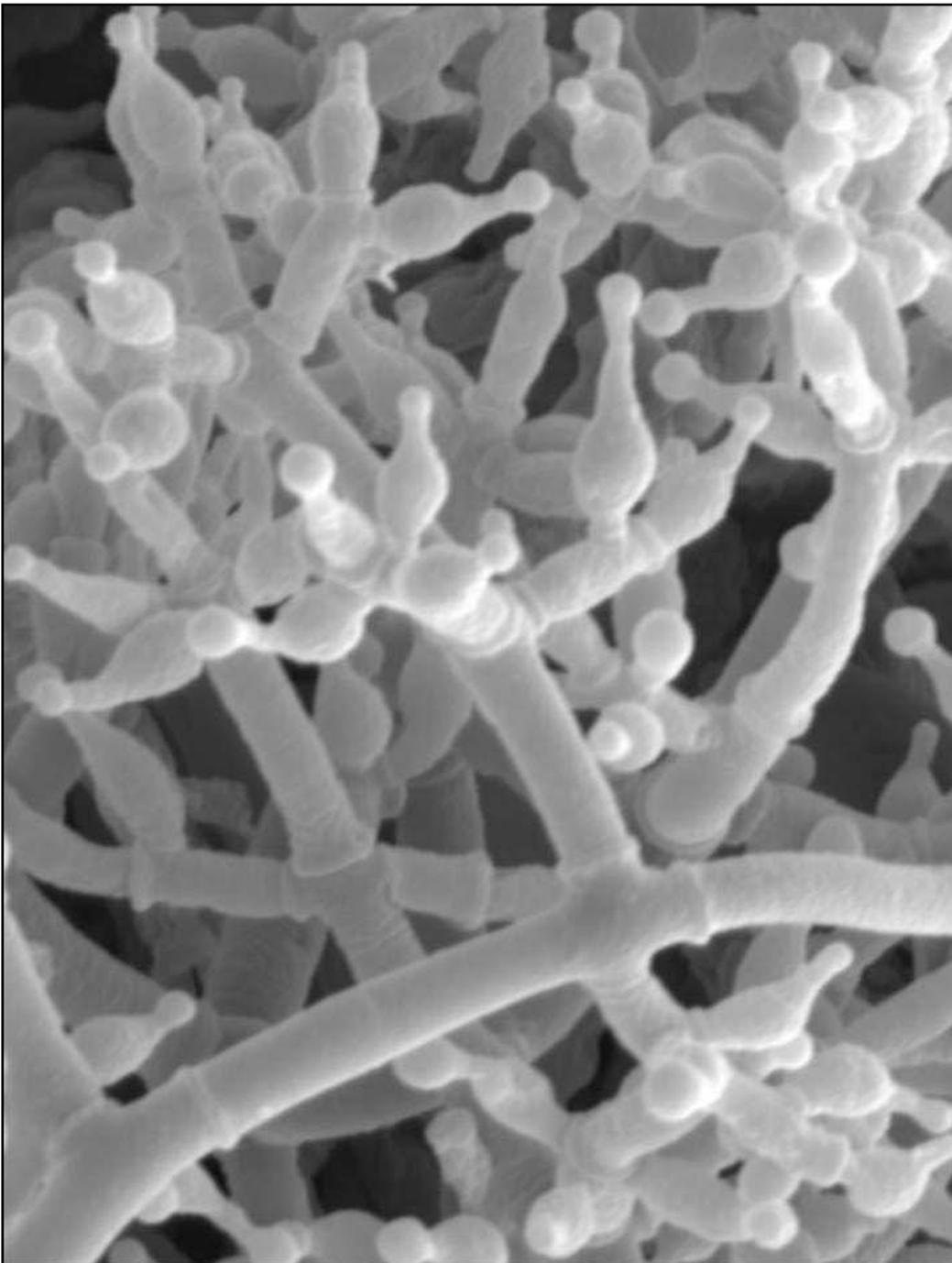


Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Filamentosos

Foto: Arquivo do Laboratório de Fitopatologia do Cenargen



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos

335 *Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
ISSN 0102-0110*

134 *Embrapa Hortaliças
ISSN 1415-2313*

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Filamentosos

Sueli Corrêa Marques de Mello
Ailton Reis
João Batista Tavares da Silva

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Arquivo do Laboratório de Fitopatologia do Cenargen

1ª edição (*online*)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Mello, Sueli Corrêa Marques de.

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Filamentosos. / Sueli Corrêa Marques de Mello, Ailton Reis e João Batista Tavares da Silva. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

25 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 335; Documentos / Embrapa Hortaliças, 134).

1. Recursos Genéticos – Micro-organismos. 2. Conservação. 3. Fungos Filamentosos. I. Reis, Ailton. II. Silva, João Batista Tavares da. III. Título. IV. Série.

589.2 - CDD

© Embrapa 2011

Autores

Sueli Corrêa Marques de Mello

Ph.D. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
sueli.mello@embrapa.br

Ailton Reis

Ph.D. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Hortaliças
ailton.reis@embrapa.br

João Batista Tavares da Silva

Ph.D. em Microbiologia, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
joao.tavares@embrapa.br

AGRADECIMENTOS

Ao colega Rogério Biaggioni Lopes, pela incorporação de informações específicas aos fungos entomopatogênicos.

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	10
Fungos filamentosos habitantes do solo	10
Benéficos às plantas	10
Prejudiciais às plantas	11
Fungos encontrados nas superfícies das plantas	11
Fungos da rizosfera e do rizoplano	11
Fungos do filoplano	12
Fungos patogênicos a invertebrados	12
Fungos endofíticos	12
Fungos saprófitos	12
Coleta de amostras	12
Enriquecimento	12
Coleta	12
Material necessário para a coleta	13
Tipos de amostras x <i>habitats</i>	13
Procedimento de coleta, acondicionamento e encaminhamento das amostras ao	13
laboratório	
Isolamento	13
Esterilização do meio e assepsia do material de trabalho	14
Técnicas de isolamento e manuseio de culturas	15
Isolamento de fungos em tecidos vegetais	15
Isolamento de invertebrados	15
Isolamento de fungos de solo	16
Isclas para isolamento de Phytophthora	16
Isolamento direto	16
Isolamento a partir de sementes – Método “Blotter”	16
Separação de fungos de bactérias	16
Purificação de culturas	17
Preparo de suspensões X contagem de esporos	17
Câmara de Neubauer	17
Micrometria	17
Conservação	18
Definição	18

Métodos de preservação	18
Armazenamento x monitoramento	18
Caracterização	18
Definição	18
Caracterização morfológica	19
Caracterização molecular	19
Caracterização fisiológica	20
Valoração	20
Definição	20
Referências	24

Fungos Filamentosos

Sueli Corrêa Marques de Mello

Ailton Reis

João Batista Tavares da Silva

Introdução

A formação de bancos de germoplasma de fungos filamentosos assume real importância, na medida em que mudanças paisagísticas ocorrem de forma acelerada, demandando o levantamento, o conhecimento e a conservação desses organismos em locais apropriados para estudos futuros. Cabe lembrar que a vasta maioria dos fungos supostamente existente na natureza, bem como as suas funções fisiológicas e metabólicas, sua filogenia e posição taxonômica permanecem desconhecidas e a serem exploradas.

Os fungos, além de exercerem funções de destaque nos seus *habitats* naturais, representam recursos genéticos para aplicação em inúmeros processos e produtos biotecnológicos. Desse modo, as coleções de culturas fúngicas, se bem estruturadas e conservadas, constituem patrimônio genético de grande valor em nosso mundo globalizado, no qual o desenvolvimento econômico e social sustenta-se, em grande parte, na biotecnologia. Portanto, as atividades de coleta, identificação, caracterização e conservação de fungos são cruciais para a comunidade científica e, em última análise, para a humanidade.

A principal estratégia de bioprospecção adotada pelas empresas multinacionais consiste na busca desses micro-organismos provenientes da maior diversidade de ambientes possível, obtendo, entre outras, amostras de solo, isolados de fungos e bactérias endofíticas e micro-organismos associados a plantas e insetos, principalmente em regiões tropicais ainda pouco exploradas (PFENNING, 2001).

Procedimentos para o isolamento e técnicas especiais de recuperação de fungos a partir do material amostrado dependem do tipo de organismo e do substrato em questão, existindo farto material bibliográfico para consulta a esse respeito, dentre os quais destacam-se os seguintes: Dhingra & Sinclair (1981), Bull *et al.* (1992), Melo e Azevedo (1997), Alves *et al.* (1998) e Pileggi (2006). Alguns aspectos são destacados a seguir, de maneira resumida, para melhor direcionar a busca de fungos de interesse para a agricultura, nos distintos ambientes em que se encontram.

Fungos filamentosos habitantes do solo

Benéficos às plantas

- Que promovem a decomposição ou a conversão da matéria orgânica em nutrientes minerais.

- Que decompõem as rochas ou solubilizam os minerais, aumentando a disponibilidade de elementos assimiláveis pelas plantas.
- Que antagonizam micro-organismos prejudiciais às plantas (hiperparasitas, produtores de metabólitos secundários com propriedades antibióticas, produtores de sideróforos, etc.).
- Biorremediadores, capazes de transformar substâncias nocivas em compostos não tóxicos ou menos tóxicos, recuperando ambientes e ecossistemas contaminados.

Prejudiciais às plantas

- Fitopatogênicos que sobrevivem no solo (“soilborn pathogens”).
- Produtores de metabólitos tóxicos às plantas.
- Antagônicos aos micro-organismos benéficos.

Fungos encontrados nas superfícies das plantas

Fungos residentes – Muitos fungos filamentosos evoluíram e se adaptaram às superfícies das plantas, em função dos compostos orgânicos por elas disponibilizados, na forma de mucilagens, resinas, substâncias voláteis ou solúveis em água, ou apenas como resíduos de células e tecidos, que lhes servem de nutrientes. As estruturas superficiais das plantas também lhes servem como abrigo, nas quais estão compreendidos diferentes nichos:

Filoplano: todas as camadas superficiais da parte aérea, especialmente das folhas, incluindo-se, também, células e tecidos epidérmicos.

Rizoplano: superfícies das raízes, com suas células e tecidos epidérmicos.

Rizosfera: camada de solo aderida às raízes.

O termo fungos epífitas diz respeito aos fungos residentes do filoplano, enquanto o termo micro-organismos colonizadores de raízes refere-se aos residentes do rizoplano e da rizosfera.

Fungos da rizosfera e do rizoplano

Benéficos às plantas:

- pela produção de substâncias indutoras de formação e crescimento de raízes e partes aéreas (fito-hormônios);
- antagonistas aos micro-organismos prejudiciais às plantas (por mecanismos diversos, tais como competição por nutrientes e espaço físico, produção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas, produtores de enzimas que atacam a parede celular de outros fungos, bacteriocinas, sideróforos e outros);
- indutores de resistência a infecção;
- fixadores de nitrogênio atmosférico, em simbiose com o sistema radicular das plantas.

Prejudiciais às plantas:

- fitopatogênicos;
- inibidores de ou antagônicos aos micro-organismos benéficos;
- produtores de metabólitos tóxicos às plantas.

Fungos do filoplano

Benéficos às plantas:

- antagonísticos aos fitopatógenos ou prejudiciais às plantas;
- indutores de reações fisiológicas de resistência a infecção.

Prejudiciais às plantas:

- fitopatógenos;
- antagonísticos a micro-organismos benéficos.

Fungos patogênicos a invertebrados

Micro-organismos capazes de atacar insetos e outros invertebrados, ocasionando enzootias ou epizootias naturais. Podem infectar diversos estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas e adultos de invertebrados aquáticos, habitantes do solo ou das plantas.

Fungos endofíticos

- Vivem no interior das plantas.
- São potencialmente úteis na agricultura e indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica.

Fungos saprófitos

Colonizadores de madeira ou xilófagos, entre outros.

Coleta de amostras

Enriquecimento

O enriquecimento é um conjunto de atividades destinadas à ampliação do acervo da coleção e pode ocorrer por meio de duas formas: coleta e intercâmbio. Neste tópico, tratar-se-á de coleta, enquanto a parte de intercâmbio será tratada em outro manual produzido pela equipe de Recursos Genéticos Microbianos.

Coleta

A coleta consiste na busca no campo de micro-organismos de interesse para serem preservados em coleção.

Material necessário para a coleta

Ferramentas para corte de material vegetal e/ou escavação de solo; sacos plásticos e de papel; etiquetas; caneta; caixas de isopor para transporte do material até o laboratório; GPS para registrar as coordenadas geográficas do local de coleta e permitir rastreabilidade.

Tipos de amostras x *habitats*

Habitats são locais que reúnem características ecológicas específicas para serem habitados por um ou uma população de um determinado organismo. A especificidade de um organismo pode exigir a vigência de condições especiais de ambiente que estão restritas a uma porção de um habitat. Entretanto, há outros organismos, entre os quais inúmeros fungos filamentosos, que são de ocorrência mais generalizada.

Procedimento de coleta, acondicionamento e encaminhamento das amostras ao laboratório

As coletas podem ser dirigidas para a busca de amostras colonizadas com os fungos de interesse em seus *habitats* ou nichos específicos. Amostras de plantas devem conter todas as partes atacadas e em diferentes fases de colonização. Para fungos de invertebrados, as amostras podem ser indivíduos mortos ou moribundos que apresentem sinais de patógenos ou parte representativa da população de um hospedeiro. Nesse segundo caso, a colônia coletada deve ser mantida sob quarentena para posterior identificação de indivíduos mortos e possivelmente infectados.

Também podem ser encontradas estruturas de patógenos dispersas no ambiente, especialmente em amostras de solo, água ou planta. Amostras de solo podem ser de solo rizosférico ou não rizosférico, cultivado ou não, dependendo do interesse. Cada amostra de solo deverá conter aproximadamente 1 kg de solo (e raízes misturadas, quando for o caso).

Após a coleta, as amostras devem ser fechadas em sacos plásticos ou de papel, etiquetadas com as informações básicas e enviadas ao laboratório o mais rápido possível. Entre as informações básicas, deverão constar pelo menos: nome do coletor, data, espécie de planta (quando se tratar de amostra vegetal) ou cultura (quando de solo cultivado) e coordenadas geográficas. A partir da mistura de várias amostras de solo de um mesmo talhão, poderão ser obtidas amostras compostas, quando for conveniente.

Para o transporte das amostras, recomenda-se o uso de caixas de isopor vedadas. O tempo máximo entre a coleta da amostra e o seu processamento no local de destino não deve ultrapassar uma semana, no caso de amostras vegetais mantidas em câmara fria. Amostras de solo, mantidas nas mesmas condições, poderão ser conservadas por alguns meses.

Isolamento

A atividade de isolamento de fungos filamentosos em meio de cultura é realizada sob condições assépticas, em uma capela de segurança (fluxo laminar vertical). Os meios de cultivo são de duas espécies: minerais ou sintéticos e naturais, podendo ambos serem

líquidos, sólidos ou semissólidos. Há meios de cultivo de uso geral, enquanto outros são específicos ou seletivos. Portanto, a escolha vai depender do organismo a ser isolado.

Para a realização do isolamento, os meios são na maioria das vezes solidificados com ágar, na proporção de 1,5 a 2,0%. De forma geral, os fungos desenvolvem-se melhor em meios abundantemente supridos com hidratos de carbono e em pH neutro ou ligeiramente ácido. O meio geral mais comumente utilizado no caso dos fungos filamentosos é o BDA (batata-dextrose-ágar):

Batatas descascadas em fatias	200 g
Dextrose	10 g
Ágar	17 g
Água destilada	1000 mL

É possível substituir os 10 g de dextrose por 5 g de sacarose. As batatas são fervidas em 500 mL de água destilada, obtendo-se o caldo de batata mediante filtragem. No restante da água destilada (500 mL), juntam-se os outros ingredientes e funde-se. Combinam-se as duas partes, ajusta-se o pH e esteriliza-se por calor úmido em autoclave ou outro equipamento adequado. Pode-se acrescentar, antes da esterilização, 20 mL de glicerina/L, a fim de evitar a desidratação muito rápida do meio.

Esterilização do meio e assepsia do material de trabalho

Uma vez que os meios são preparados para cultivar fungos em culturas puras, todos os organismos estranhos ao que se pretende cultivar devem ser eliminados. Daí a necessidade de se esterilizar o meio e realizar a assepsia do material de trabalho.

A esterilização pode ser feita em autoclave a 15 libras de pressão, durante pelo menos 15 minutos. Meios contendo açúcares que se hidrolisam a temperaturas da autoclave devem ser esterilizados por fervura a 100° C ou em banho-maria a 60° C, por três dias consecutivos, em esterilizador de Arnold, durante uma hora. O crescimento de bactérias pode ser inibido por adição de antibióticos ao meio. O material necessário para o processo de isolamento de fungos filamentosos varia com o tipo de amostra. Em geral, são necessários os seguintes materiais:

- água destilada esterilizada;
- álcool 96° e 70° GL;
- solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%;
- lâmina ou estilete;
- alça de platina e agulha de transferência;
- pinça;
- agulhas, pinças e outros instrumentos devem ser previamente autoclavados, ou limpos com álcool e flambados;
- placas de Petri, frascos do tipo Erlenmeyer ou tubos de ensaio, contendo meio de cultura.

O meio de cultura deve ser preferencialmente distribuído em placas de Petri. As mais utilizadas são as de 90 ou 100 mm. Cada placa deve receber de 15 a 20 mL de meio, de modo que 1000 mL de meio são suficientes para o preparo de 40 a 50 placas.

Excepcionalmente, utilizam-se frascos do tipo Erlenmeyer (isolamento de *Microcyclus ulei*, por exemplo), ou tubos de ensaio, quando o isolamento é feito pela captura de esporos por meio de instrumentos de ponta fina (agulha de transferência). Assim que são retirados da

autoclave, os tubos de ensaio devem ser colocados em posição inclinada, para que o meio se solidifique nesta posição, aumentando a superfície para a inoculação. O material vegetal (folhas, caules, inflorescência, raízes e sementes) deve ser previamente esterilizado superficialmente, empregando-se solução de hipoclorito de sódio a 5%.

Técnicas de isolamento e manuseio de culturas

Isolamento de fungos em tecidos vegetais

Para o isolamento de fungos a partir de material vegetal, deve ser utilizada amostra o mais fresca possível, de maneira a evitar a contaminação por micro-organismos saprofitos. Se for necessário guardar para uso posterior, o material vegetal deve estar acondicionado em sacos plásticos e mantido em câmara fria. Tecidos vegetais (folhas, raízes, tubérculos, etc.) devem ser cortados em pedaços, que são tratados, assim como sementes, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por cinco minutos, para inviabilizar os organismos presentes na superfície.

Em caso de folhas serosas, antes de colocar na solução de NaOCl, estas devem ser tratadas com álcool para dissolver a cera. Se esse procedimento não der resultado, colocar em etanol 70%, ou Tween 20, para quebra a tensão superficial, tornando a folha mais hidrofílica.

Quando se deseja induzir a esporulação, os pedaços vegetais são colocados na superfície do meio em placas de Petri esterilizada contendo duas folhas de papel de filtro esterilizadas em autoclave e umedecidas com água destilada esterilizada (quatro pedaços/placa). As placas são mantidas fechadas e, quando surgirem os esporos, estes são transferidos para meio de cultura.

Quando o que se deseja é o crescimento de micélio (fungos endofíticos, ou fungos de difícil esporulação em meio comum), o tecido vegetal deve ser bem lavado, desinfetado superficialmente com a solução de NaOCl a 1% e cortado com lâmina flambada, retirando-se a casca (quando for o caso) e cortado em pequenos pedaços nos locais das lesões. Os pedaços do tecido são, então, transferidos para placas com meio de cultura. Após 3 a 5 dias, as colônias de interesse devem ser transferidas para novas placas com meio de cultura.

Utiliza-se a técnica de diluição para fungos que produzem muitos esporos. Coloca-se o pedaço de tecido vegetal em placa esterilizada, e sobre esta uma gota de água esterilizada. Quebra-se o tecido com bastonete de vidro. Com alça de transferência, toma-se uma gota e distribui-se em placas, formando riscas. Ao surgirem colônias, as mais isoladas (distantes) são transferidas para outra placa com meio, para obtenção de cultura pura.

Isolamento de fungos de invertebrados

Em muitos casos, é possível fazer a transferência direta de estruturas de patógenos presentes sobre cadáveres do hospedeiro para superfície do meio de cultura, em pontos opostos ou em estrias, utilizando-se uma alça de platina. Em alguns casos pode-se fazer a transferência do inseto ou de partes do inseto atacado, previamente desinfetado com hipoclorito de sódio 0,5% e álcool 70%, para a superfície do meio. Na maioria dos casos recomenda-se a transferência de estruturas do patógeno retiradas do hospedeiro morto

para solução de água destilada + cloreto de sódio 0,85%. Após diluições sucessivas, transferir 100 μ L da suspensão para o meio de cultura e espalhar com uma alça de Drigalsky. Em todos os casos, as placas contendo o material devem ser mantidas em câmara climatizada (entre 22° e 28° C e fotofase de 12 horas) e acompanhadas diariamente.

Isolamento de fungos de solo

Coloca-se 1 g de solo em 9 mL de água. Na primeira diluição, pode-se adicionar sodium carboxymethyl cellulose a 1%. Agitar bem. Fazer a série de diluições: 1:10, 1:100, 1:1000 e assim por diante. Espalha-se cerca de 200 μ L da diluição na superfície do meio, em placas de Petri, usando a alça de platina. Devem ser tentadas duas ou três diluições a partir de 1:100, para obterem-se colônias isoladas, que serão transferidas para outras placas contendo meio, e então gerarem-se culturas puras. Na literatura, são descritos meios específicos para cada gênero ou espécie de fungos, por isso essa questão não será abordada neste manual.

Iscas para isolamento de Phytophthora

Utilizar frutos de limão, tomate ou maçã. O primeiro isolamento é feito no campo, colocando-se um pouco do solo suspeito de contaminação em uma abertura feita no fruto. Recoloca-se o pedaço de tecido retirado e fecha-se com fita adesiva. O material deve ser levado imediatamente ao laboratório, onde será mantido sob temperatura ambiente por dois ou três dias, antes da realização do isolamento em meio de cultura.

Isolamento direto – Para fungos que produzem corpos de frutificação sobre o material doente ou estruturas de resistência (por exemplo, no solo). Essas estruturas são coletadas e colocadas diretamente sobre o meio de cultura.

Isolamento a partir de sementes – Método “Blotter”

Placas de Petri, contendo duas folhas de papel de filtro, são esterilizadas e a cada uma são vertidos quatro mL de água destilada esterilizadas. As sementes previamente desinfetadas superficialmente são distribuídas nas placas.

Separação de fungos de bactérias

Colônias obtidas dos isolamentos podem conter contaminações por bactérias. Para “limpá-las”, pode-se:

- baixar o pH do meio. Para isso, deve-se adicionar ácido tartárico (3 a 5 gotas/100 mL de meio);
- como alternativa, utilizar inibidores de bactérias (antibióticos e corantes). Chloramphenicol, por exemplo, é um antimicrobiano bacteriostático de largo espectro de ação, superior a tetraciclina e, sendo ativo até 145° C, pode ser adicionado ao meio antes da esterilização;
- incubar em temperaturas mais baixas (menos de 25° C), que desfavorecem o desenvolvimento da maioria das bactérias contaminantes;
- utilizar a técnica da lamínula: colocar uma lamínula sobre o meio, a certa distância do ponto de inoculação. O fungo cresce sobre a lamínula;
- realizar a transferência direta, a partir de regiões “limpas” da cultura.

Purificação de culturas

Uma colônia pode conter mais de um fungo. Para obtenção de cultura pura daquele desejado, podem ser utilizados os seguintes métodos:

- “Hyphae Tip”: retiram-se pontas de hifas mais isoladas, que são depositadas em novo meio de cultura;
- risca sobre placas: para fungos que contenham grande número de esporos, preparam-se diluições seriadas a partir de uma suspensão concentrada de esporos. Espalham-se gotas das diluições sobre meio de cultura em placas, para se obter colônias isoladas. Esse método é também utilizado para a obtenção de culturas monospóricas.

Preparo de suspensões x contagem de esporos

O preparo de suspensões com concentrações de propágulos conhecida é necessária para diversos estudos, como realização de testes de patogenicidade, virulência, etc. As suspensões de esporos são obtidas em água. Para fungos hidrofóbicos, é importante a adição de Tween 20 (0,01%), que torna os esporos mais hidrofílicos e dispersos. Concentrações muito elevadas devem ser diluídas, a fim de facilitar a contagem.

Câmara de Neubauer

A câmara de Neubauer, também referida como hemacitômetro, é uma lâmina de vidro mais alta do que uma lâmina comum, dividida em câmaras (quadrados ou quadrantes) de medida conhecida, com lamínula especial, para a contagem de esporos. Os quadrantes são de três tipos, dependendo das subdivisões, de modo que o quadrante onde serão contados os esporos seja escolhido de acordo com o tamanho dos esporos em questão. Instruções claras sobre o uso da câmara de Neubauer podem ser encontradas na internet (<http://bervieira.sites.uol.com.br/neubauer.htm>).

Micrometria

Para medir o tamanho de esporos, bem como outras estruturas fúngicas (células conidiogênicas, conidióforos, clamidósporos, etc.), utiliza-se lente de aumento, preferencialmente de 40x, com lamínula contendo uma régua pequena e direções definidas para mover o micrômetro sob a lente. A ocular é especial e possui escala (divisões a serem utilizadas como padrões). Antes do início das medições, é necessário fazer a calibragem da ocular com a lamínula, para saber quanto corresponde cada divisão. Nas medições, podem ser utilizadas lâminas comuns com as estruturas a serem medidas.

Atualmente já se dispõe de câmeras para captura de imagens, com programas de computador para micrometria que se acoplam ao microscópio, o que reduz significativamente os esforços para tomada de medidas.

Conservação

Definição

Manutenção dos isolados vivos por meio de métodos de curta, média e longa duração. Sua finalidade é ter o isolado disponível, a qualquer momento, para estudos diversos.

Métodos de preservação

Os métodos de preservação usualmente aplicados envolvem basicamente quatro técnicas bem diferenciadas: a) a criopreservação ou armazenamento do cultivo, adicionado de substâncias protetoras, a temperaturas ultrabaixas (ex.: -180° C); b) armazenamento em temperatura ambiente, um método antigo, porém ainda hoje bastante utilizado na preservação a longo prazo, que consiste na adição de óleo mineral às culturas estabelecidas em meio de cultivo; c) desidratação, em que se reduz significativamente o conteúdo de água da célula e se previne a reidratação, como se observa na liofilização; a secagem líquida, em que se utiliza gelatina ou secagem em areia, solo, sílica gel ou papel; d) subcultivos contínuos, que consistem na manutenção da cultura em meio adequado com transferências a intervalos variáveis. Este último só é recomendado para conservação por curtos períodos, até que outros métodos sejam aplicados, ou para coleções de trabalho. Alguns fungos, como *Trichoderma* spp., podem ser mantidos viáveis por períodos relativamente prolongados, sem perder suas características morfológicas e fisiológicas, em água estéril tamponada (método Castellani).

Os riscos de perda de isolados podem ser significativamente reduzidos, desde que se utilizem pelo menos dois métodos distintos para cada organismo e seja estabelecida uma rotina de avaliação após os procedimentos de preservação, estimando-se a viabilidade e observando-se as características morfológicas das colônias reativadas em meios apropriados.

Armazenamento x monitoramento

Amostras dos isolados armazenados devem ser reativadas periodicamente, em meio apropriado para cultivo do organismo em questão, visando o monitoramento da viabilidade dos isolados.

Caracterização

Definição

São estudos específicos com isolados fúngicos, visando ao entendimento de sua morfologia, genética e fisiologia. Importância: o conhecimento das características particulares do isolado é que determina o seu potencial de uso futuro. Assim, a existência de um banco de caracteres é fundamental para a exploração socioeconômica da coleção.

Caracterização morfológica

A taxonomia clássica utiliza, para identificação de espécies, as características morfológicas, especialmente as das estruturas reprodutivas e culturais. Para tanto, são obtidas culturas puras dos isolados, utilizando meios e condições de cultivo (iluminação, temperatura, etc.) que devem ser ajustados para cada organismo. As preparações para exame microscópico e avaliações micrométricas devem ser preparadas cuidadosamente de forma a manter intactas as estruturas, que devem ser adequadamente coradas.

O “Dictionary of the Fungi” cobre todos os organismos tradicionalmente estudados pelos micologistas, incluindo líquens, agentes de bolores, cogumelos e leveduras, constituindo assim, a principal referência internacional para todos aqueles que trabalham com fungos. Esta classificação é baseada nas fases sexuadas (teleomórficas). A classificação com base no anamorfo (fase assexuada) é aceita quando esta fase não está conectada com uma fase sexuada (teleomorfo desconhecido ou de difícil obtenção). Portanto, estudos de taxonomia com base em critérios morfológicos muitas vezes têm de estar associados a estudos fisiológicos que possibilitem a produção das estruturas sexuais do fungo.

Vantagem: a caracterização morfológica constitui o primeiro método de caracterização de fungos. É o conhecimento das características micro e macroscópicas do organismo que permite agrupá-lo em níveis taxonômicos, embora esse tipo de caracterização venha perdendo terreno pelas tecnologias baseadas no genoma (molecular). A maior vantagem desse método é que permite separar e identificar a maioria dos fungos filamentosos em nível específico, mesmo em laboratórios que dispõem de poucos recursos. Bastam um bom microscópio e chaves de identificação disponíveis na literatura.

Desvantagem: vários grupos de fungos estabelecidos em termos de espécies ou mesmo de gêneros possuem taxonomia confusa. Os critérios morfológicos muitas vezes não permitem uma separação acurada. É uma técnica dispendiosa em termos de tempo e exige uma grande experiência. A formação do profissional demanda muito tempo.

Caracterização molecular

Amplificações e sequenciamento direto do DNA ribossomal (rDNA) foi uma das primeiras aplicações de PCR dentro da micologia. Genes do rDNA tem regiões conservadas e variáveis, ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*), as quais são utilizadas para o estudo de grupos taxonômicos relacionados. *Primers* universais e específicos tem se mostrado eficazes, pois permitem que essas regiões ITS sejam amplificadas, usando as sequências conservadas de rDNA. Com o auxílio de programas de computador, a partir dos dados de PCR é possível identificar espécies inequivocamente, embora algumas compartilhem sequências ITS1 e ITS2 idênticas, sendo, portanto, indistinguíveis por esse método. Porém, essa tecnologia tem evoluído muito, e novos programas são desenvolvidos, assim como novos marcadores (gene da Calmodulina e fator de alongação, entre outros) são introduzidos para resolver as dúvidas taxonômicas que ainda perdurem.

Vantagens: possibilita a solução de dúvidas taxonômicas nos casos em que a distinção dos indivíduos pela taxonomia morfológica é confusa; a formação do profissional exige pouco tempo de treinamento. Desvantagens: é um método dispendioso e exige um laboratório bem aparelhado.

Caracterização fisiológica

Patogenicidade: visa verificar se um isolado desconhecido é patogênico a uma planta ou animal ou verificar se um isolado conhecido não perdeu sua capacidade de infectar e causar doenças em seu hospedeiro. Os isolados devem ser inoculados em seu hospedeiro e incubados sob condições que favoreçam a colonização. No caso de fungo antagonista, são feitos testes para determinar se é um hiperparasita, por exemplo.

Virulência: para fitopatógenos, diz respeito ao grau dos sintomas ocasionados. Normalmente é medida com o auxílio de escalas diagramáticas, que são específicas para cada patossistema. Para escolha ou adaptação de uma escala diagramática, deve ser feita consulta bibliográfica. A agressividade diz respeito ao tempo que o fungo patogênico leva para causar infecção. É medida em horas ou dias. No caso de fungos de invertebrados, a virulência ou agressividade representa a intensidade ou o grau com que o patógeno causa a enfermidade. É uma resposta do hospedeiro submetido a uma determinada quantidade de inóculo e mostra a capacidade com que o patógeno penetra e supera o sistema de defesa natural do indivíduo. É medida, em geral, pela velocidade com que o patógeno causa a morte do hospedeiro. De forma grosseira, o coeficiente angular das curvas de tempo-resposta (inclinação da curva) para diferentes espécies ou isolados, determinado em bioensaios controlados, indica a virulência ou agressividade daquele patógeno.

Condições de cultivo: são específicas, ou seja, dependem da espécie ou mesmo do isolado dentro de uma espécie considerada. Portanto, para cada isolado, devem ser conduzidos ensaios para a determinação, pelo menos, dos seguintes parâmetros: meio de cultivo (líquido, substrato sólido ou gelificado), composição do meio de cultivo, temperatura de incubação e fotofase.

Valoração

Definição

Significa agregar valor aos isolados mantidos na coleção. Sua finalidade é determinar o potencial de uso dos isolados. A determinação do potencial de uso é feita com base nas características do isolado. Deste fato deriva a importância de se estabelecer um banco de caracteres, que é o resultado de todos os estudos realizados em termos taxonômicos, fisiológicos, moleculares, bioquímicos, etc.

Fotos: Claudio Bezerra

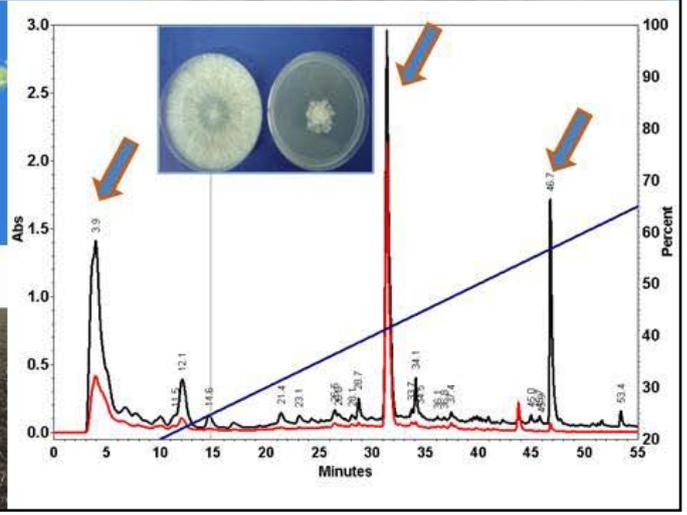
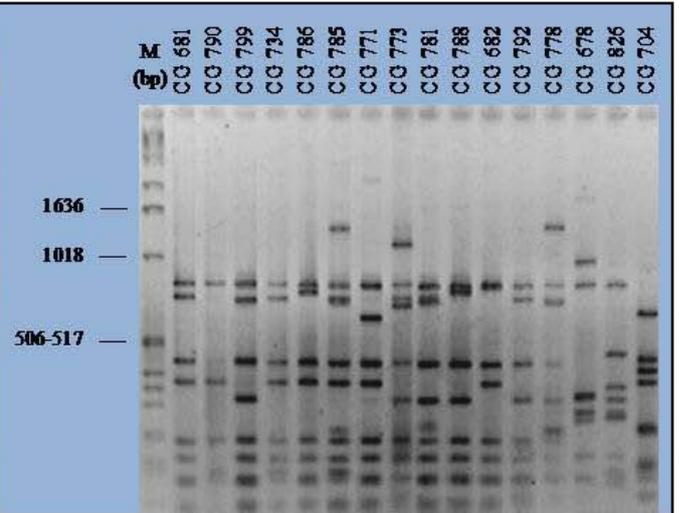


Figura 1: representação ilustrativa de coleta de amostras de solo e isolamento de fungos em meio de cultura.

Foto: Claudio Bezerra



Foto: Arquivo do Laboratório de Fitopatologia do Cenargen



Fotos: Arquivo do Laboratório de Fitopatologia do Cenargen

Figura 2: representação ilustrativa das atividades de caracterização e estudo do potencial de uso de fungos (valoração dos recursos genéticos).

Fotos: Claudio Bezerra



Figura 3: representação ilustrativa de alguns dos principais métodos utilizados na conservação de fungos filamentosos (criopreservação, Castellani e *ultrafreezer*).

Referências

- ALVES, S. B. A.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JR., A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. A. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba, SP, FEALQ, 1998. p. 637-764.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1981. **Basic plant pathology methods**. Florida, USA: CRC Press, 1981. 355 p.
- BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology, **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 46, p. 219-252. 1992.
- MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1997. p. 167-183.
- PFENNING, L. H. Potencial de uma rede de coleções de microrganismos: Fungos de interesse agroindustrial e biotecnológico. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2001. p. 159-162.
- PILEGGI, S. A. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 125 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*