

## **MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO PARA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS HABITANTES DO SOLO**

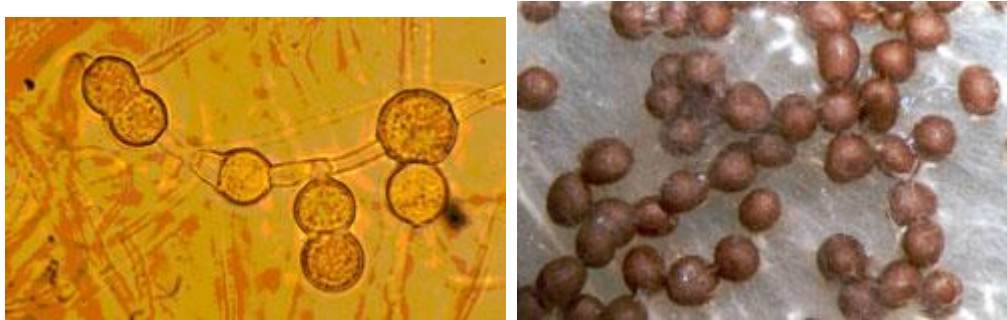
**César Júnior Bueno**

PqC do Pólo Regional do Extremo Oeste/APTA

[cjbueno@apta.sp.gov.br](mailto:cjbueno@apta.sp.gov.br)

As culturas exploradas economicamente são infectadas por fitopatógenos causadores de doença, ocasionando perdas e prejuízos financeiros para os produtores. Dentre os fitopatógenos há os fungos que habitam o solo, tais como *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia* sp. e outros. Estes patógenos produzem estruturas de resistência na ausência de plantas hospedeiras e/ou condições climáticas desfavoráveis. Teliósporos, ascocarpos, oósporos, escleródios e clamidósporos são exemplos de estruturas de resistência (Figura 1). Além do fato de algumas estruturas de resistência sobreviverem por muito tempo no solo na ausência de planta hospedeira, a presença destas estruturas pode inviabilizar muitas vezes medidas de controle para o patógeno.

Figura 1. Estruturas de resistência formadas por alguns fungos fitopatogênicos habitantes do solo. Por exemplo, clamidósporo<sup>a</sup> é muito comum de ser formado pelo fungo *Fusarium* sp., escleródio<sup>b</sup> por *Sclerotium rolfsii* e microescleródio<sup>b</sup> por *Macrophomina phaseolina*.



Fonte<sup>a</sup>: [http://www.botany.hawaii.edu/faculty/gardner/diseases/Koa%20dieback/koa\\_wilt.htm](http://www.botany.hawaii.edu/faculty/gardner/diseases/Koa%20dieback/koa_wilt.htm)

Fonte<sup>b</sup>: Bueno, C.J. Produção e preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. Botucatu, 2004. 101f. Tese em Agronomia/Proteção de Plantas – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

A preservação de fungos fitopatogênicos por longos períodos de tempo é importante para que pesquisas possam ser realizadas com estes patógenos a qualquer momento com o intuito de se buscar métodos alternativos para o seu controle. O método de preservação deve manter as características originais dos fitopatógenos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade (1). Essas características têm importância para fins industriais, de ensino ou de pesquisa (5). Os principais métodos de preservação utilizados são temperaturas baixas ou congelamento, nitrogênio líquido, sílica-gel, solo ou areia, tecido seco de hospedeiro infectado, repicagens periódicas, água destilada ou método de Castellani, liofilização e óleo mineral (1, 4). Dhingra & Sinclair (3) relatam que não existe nenhum método universal para armazenar patógenos de plantas, pois a seleção do método deve ser baseada na natureza do patógeno e nas suas vantagens e desvantagens.

A preservação de fungos fitopatogênicos por longos períodos de tempo é importante para que pesquisas possam ser realizadas com estes patógenos a qualquer momento com o intuito de se buscar métodos alternativos para o seu controle. O método de preservação

deve manter as características originais dos fitopatógenos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade (1). Essas características têm importância para fins industriais, de ensino ou de pesquisa (5). Os principais métodos de preservação utilizados são temperaturas baixas ou congelamento, nitrogênio líquido, sílica-gel, solo ou areia, tecido seco de hospedeiro infectado, repicagens periódicas, água destilada ou método de Castellani, liofilização e óleo mineral (1, 4). Dhingra & Sinclair (3) relatam que não existe nenhum método universal para armazenar patógenos de plantas, pois a seleção do método deve ser baseada na natureza do patógeno e nas suas vantagens e desvantagens.

Dhingra & Sinclair (3) relatam que além do fato do método de repicagem periódica implicar em consumo de tempo e pessoal, muitos fungos podem adaptar-se ao crescimento saprofítico induzido pelo método, levando os organismos a perderem a capacidade de esporular e a patogenicidade. Este método consiste em transferir, periodicamente, colônias jovens de fitopatógenos, que crescem em meio de cultura, para novos meios. O fungo de solo *Sclerotinia sclerotiorum* pode ser preservado neste método por um curto período de tempo (6).

Os patógenos podem ser preservados por longos períodos de tempo no método chamado de óleo mineral (3). No entanto, neste método, os fitopatógenos continuam a crescer e, conseqüentemente, variações na sua morfologia, fisiologia e capacidade de esporular podem ocorrer. O método de preservação em óleo mineral consiste primeiramente em multiplicar o patógeno em meio de cultura dentro de um frasco (por exemplo, tubo de ensaio) e, em seguida, cobrir essa colônia com óleo mineral esterilizado. Posteriormente, esse frasco pode ser mantido em temperatura ambiente ou de refrigerador. Segundo Dhingra & Sinclair (3), o método de óleo mineral não é muito indicado para preservar o fungo de solo *Fusarium* sp. Neste método, o fungo de solo *Rhizoctonia solani* pode ser preservado por até 5 anos. Culturas de *R. solani* não podem ser preservadas em temperatura de refrigerador (0-7°C) e em temperatura de freezer (-20°C), devido à perda de viabilidade (6). Culturas de *Sclerotium rolfii* são armazenadas por longos períodos de tempo (acima de 5 anos), utilizando o método de preservação em óleo mineral, sendo as culturas mantidas neste método em temperatura ambiente (6). Neste método, ainda há o relato de preservação de um ano ou mais dos fungos de solo *Phytophthora* sp. e *Pythium* sp. Para o fungo *Pythium* sp., a preservação em óleo mineral deve ser feita em ambiente escuro e na temperatura de 15 a 23°C (6).

Muitos isolados de *R. solani* podem ser preservados por 10 anos ou mais em grãos (6). Os grãos, como por exemplo de arroz, são desinfestados e assim que o fungo colonizá-los, estes são colocados em placas de Petri estéril, seladas e armazenadas em temperatura de freezer.

Alguns patógenos de plantas podem ser preservados por longos períodos quando utiliza-se o método de armazenagem de tecidos secos de hospedeiro infectado. Posteriormente, estes tecidos são mantidos em ambientes com baixa umidade e em temperatura de refrigerador (3). O fungo de solo *Thielaviopsis* sp. pode ser preservado neste método por 3 anos ou mais (6). Para este fungo, as raízes infectadas de suas plantas hospedeiras é que são armazenadas.

O método Castellani é muito utilizado para preservar fungos fitopatogênicos, onde colônias puras do fungo são colocadas em um pequeno frasco contendo água destilada esterilizada ou solução salina, sendo posteriormente selado e armazenado em temperatura ambiente ou de refrigerador (3). Há relatos de preservação de muitos fungos neste método, inclusive dos que habitam o solo tais como *Fusarium* sp., *R. solani*, *V. dahliae* e *Phytophthora* sp. (3, 6). Especificamente para o fungo *Pythium* sp., há uma variação nesta técnica, que consiste em introduzir sementes de linho mais água deionizada ao invés de utilizar somente água destilada ou solução salina. Após a repicagem de discos de micélio contendo o fungo para os frascos, estes são mantidos em ambiente escuro e em temperatura de 15 a 25°C. O fungo *Pythium* sp. permanece preservado neste método por 5 anos ou mais (6).

Recomenda-se o uso do método de preservação em sílica-gel quando os métodos de liofilização ou nitrogênio líquido não forem adequados. Este método consiste em espalhar uma suspensão de esporos de fitopatógenos sobre a sílica-gel e, em seguida, armazená-la em temperatura ambiente ou em baixa temperatura. Neste método, há relato de preservação de várias espécies de *Fusarium* com duração de 5 anos, desde que a cultura seja armazenada em temperatura de 5°C (3).

Há duas técnicas de preservação de culturas de fungo no método em solo. A primeira consiste em utilizar solo estéril infestado com inóculo do patógeno. Este solo deve ser imediatamente seco após a infestação e armazenado em temperatura de refrigerador. Na segunda técnica, o solo previamente infestado com o microrganismo é incubado, permitindo assim, o crescimento do fungo. Para *R. solani* e *Fusarium* sp., há relato do uso deste método com preservação por longos períodos de tempo, mas com modificações no método (3). Culturas de *V. dahliae* podem ser preservadas por vários anos em um mistura de solo

autoclavado (solo, perlita e turfa) quando mantida em temperatura de 5°C (6). O método de armazenagem em solo tem sido trocado pelos métodos de liofilização ou nitrogênio líquido (3). Para o fungo de solo *Thielaviopsis* sp., o método consiste em infestar solo estéril com baixa umidade ou substrato pobre em nutrientes (areia) com uma suspensão de clamidósporos. Neste método, o solo (ou a areia) infestado deve ser mantido em temperatura ambiente ou em baixas temperaturas para que haja preservação do fungo por longos períodos. Isolados deste patógeno podem apresentar variações na cor da hifa, tamanho e número de esporos e, também, na sua virulência se mantidos em solo estéril com alta umidade (6).

O método de congelamento é utilizado somente para microrganismos que suportam temperaturas abaixo de freezer e que não sofram interferências em suas características ao retornarem à temperatura ambiente (3). Há relatos da preservação do fungo de solo *M. phaseolina* neste método por longos períodos de tempo (6).

O método de conservação em nitrogênio líquido é muito utilizado para fungos fitopatogênicos. Neste método, a atividade metabólica dos microrganismos é muito baixa. O nitrogênio líquido não é mutagênico e não influencia as características morfológicas e patogênicas dos fungos (3). Isolados de *R. solani*, de *Phytophthora* sp. e de *Pythium* sp. são preservados neste método por 5-6 anos (6). Recomenda-se a preservação de espécies de *Fusarium* neste método (6). Nesta técnica é muito comum a adição de substâncias crioprotetoras (por exemplo, o glicerol) em suspensão de micélio ou de esporos de fungos antes de colocar tais suspensões no nitrogênio líquido. No entanto, não há relatos da colocação de substâncias crioprotetoras em suspensão de estruturas de resistência de fungos de solo, o que poderia implicar em aumento no tempo de preservação e garantir ainda mais a não ocorrência de modificações genéticas.

O método de liofilização também tem sido muito utilizado para armazenar microrganismos por longos períodos. Neste método, os patógenos ou suas estruturas perdem água e são armazenados na ausência de oxigênio e vapor de água (3). Este método é utilizado para preservar várias espécies de *Fusarium* e de *Pythium* (6). Desde 1978, o centro de pesquisa de *Fusarium*, na Universidade do Estado de Pensilvânia, vem empregando esta técnica, sendo que das cerca de 16.000 culturas, todas ainda estão viáveis (6). Há relato de preservação do fungo *Pythium* sp. por 5 anos ou mais (6) quando se utilizada esta técnica em suas estruturas de resistência (oósporos).

Isolados de *Macrophomina* são preservados na forma de microescleródios formados sobre palitos de madeira. Estes palitos são colocados em placa de Petri estéril, selada e armazenada em temperatura ambiente. Há relato de preservação de isolados deste fungo neste método por até cinco anos (6). Microescleródios de *V. dahliae* são formados em colônias do fungo, desenvolvidas em meio de BDA, por 15 dias, e seca com sulfato de cálcio por 72 horas a 22-25°C. O pó, contendo as estruturas de resistência do fungo, é colocado em envelopes e, em seguida, estes envelopes são armazenados em ambiente seco. Nesta condição, o fungo fica preservado por dois anos ou mais (6).

Figueiredo & Pimentel (4) relatam que quanto menor for a atividade biológica dos microrganismos menor é a possibilidade de ocorrerem modificações genéticas. Isto ajuda a preservar as características de esporulação e patogenicidade dos fitopatógenos. Portanto, a preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo deve ser almejada, pois na natureza, essas estruturas permanecem latentes no solo por longos períodos de tempo na espera de plantas hospedeiras. Além disto, outro ponto a ser almejado é descobrir a temperatura adequada para armazenar essas estruturas.

Bueno et al. (2), enfocando a idéia de se preservar as estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo e de se buscar a melhor temperatura para armazená-las, desenvolveram novas metodologias de preservação para os fungos *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. De acordo com Bueno et al. (2), a produção de clamidósporos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 deve ser feita em pó de talco e a manutenção das estruturas neste método deve ocorrer em temperatura de geladeira por até um ano. Microescleródios de *M. phaseolina* devem ser produzidos em substrato areno-orgânico (Figura 2) e a manutenção das estruturas neste método deve ocorrer em temperatura de geladeira por até um ano. A produção de escleródios individualizados de *S. rolfsii* deve ocorrer na superfície do meio de BDA+oxitetraciclina e as estruturas precisam ser mantidas em temperatura ambiente por até um ano. Já a produção de escleródios individualizados de *Sclerotinia sclerotiorum* deve ser feita em meio de feijão+fubá e suas estruturas devem ser mantidas em temperatura de freezer por até um ano.

De acordo com Singleton et al. (6), escleródios de *S. sclerotiorum*, após serem removidos de plantas doentes ou de meios de cultura, podem ser preservados por muito tempo desde que mantidos em temperatura de 2-5°C.

Figura 2. Frasco com substrato areno-orgânico, contendo microescleródios de *Macrophomina phaseolina*, e pronto para ser armazenado em temperatura de geladeira ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ).



Fonte: Bueno, C.J. Produção e preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. Botucatu, 2004. 101f. Tese em Agronomia/Proteção de Plantas – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Novos métodos para preservar estruturas de resistências de fungos fitopatogênicos habitantes do solo devem ser desenvolvidos.

Para finalizar, o tempo máximo de preservação precisa ainda ser determinado para muitos métodos já desenvolvidos para alguns fungos de solo.

## Referências

1. APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 421-424, 2001.
2. BUENO, C. J.; AMBROSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 42-50, 2006.



3. DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
4. FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. V. Métodos utilizados para conservação e fungos na micoteca da seção de micologia fitopatológica do instituto biológico. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 4, p. 299-302, 1975.
5. PIMENTEL, C. P. V.; PITTA, G. B. P.; FIGUEIREDO, M. B. Preservação da patogenicidade de alguns fungos conservados em água destilada. **O Biológico**, São Paulo, v. 46, n. 12, p. 279-308, 1980.
6. SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. 265p.