

ESTABELECIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE PRESERVAÇÃO DE CULTURAS DOS FUNGOS *Pyrenophora teres* E *Bipolaris sorokiniana*

Rayssa Bizetti Cano (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Giovanna Seron, Paula Rodrigues (Co-orientador) e Dauri José Tessmann (Orientador). E-mail: djtessmann@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Maringá, PR.

Ciências Agrárias / Agronomia / Fitossanidade / Fitopatologia

Palavras-chave: Fungos necrotróficos; Conservação; *Hordeum vulgare* L.

RESUMO

Manter microrganismos viáveis a longo prazo é o objetivo principal da preservação das culturas fúngicas, e há métodos de curto, médio e longo prazo para prolongar a viabilidade dos fungos. O método mais comum é a repicagem periódica, que é caracterizado como método de curto prazo, já a médio e longo prazo destacam-se o óleo mineral, Castellani, congelamento e papel-filtro. No cultivo da cevada, os fungos *Pyrenophora teres* e *Bipolaris Sorokiniana* causam, respectivamente, a Mancha em Rede e Mancha Marrom, e podem sobreviver em restos culturais no solo. Visto que, manter culturas fúngicas viáveis por um longo período é um desafio, o objetivo deste estudo é estabelecer e avaliar cinco métodos de conservação para os fungos *P. teres* e *B. sorokiniana*. Os cinco métodos foram: Repicagem periódica, Castellani, óleo mineral e congelamento à -80°C em glicerol e em tiras de Papel-filtro. Foram avaliados cinco isolados de cada espécie, e mensalmente repicados em novos meios de cultura. O método de preservação influenciou o crescimento micelial dos fungos. Os métodos de preservação de Castellani e papel-filtro para *Bipolaris sorokiniana* e de repicagem periódica para *Pyrenophora teres* proporcionaram melhor crescimento micelial em comparação com os demais métodos de preservação.

INTRODUÇÃO

A manutenção de culturas fúngicas é fundamental para pesquisas básicas e aplicadas, e tem como principal finalidade manter os microrganismos viáveis em longo prazo (GONÇALVES et al., 2016). De acordo com o parasitismo do fungo, eles podem ser agrupados em parasitas obrigatórios, que necessitam da planta hospedeira viva para completar seu ciclo, e parasitas não obrigatórios, ou fungos necrotróficos que podem sobreviver parte do ciclo de vida em restos culturais (AGRIOS, 2004).

Para fungos fitopatogênicos de comportamento necrotrófico, a preservação ex situ, fora do local de origem, é possível por meio das coleções de culturas, que garante a sobrevivência, estabilidade e a pureza de linhagens (BELOTI, 2015). Tratando-se de fungos necrotróficos, existem diversos métodos de conservação, e são divididos de

acordo com o tempo de armazenamento: (a) métodos de curto prazo, como repicagem periódica; (b) métodos de médio prazo como óleo mineral, Castellani, congelamento e papel-filtro; e (c) métodos de longo prazo, como liofilização e criopreservação em -80°C e (GONÇALVES et al., 2016).

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) é um cereal comumente cultivado em regiões de clima sub-temperado que favorece a ocorrência de doenças fúngicas como, *Pyrenophora teres* e *Bipolaris sorokiniana*, agentes causais da Mancha em Rede e da Mancha Marrom, respectivamente (REUNIÃO... 2019). Os dois fungos supracitados comportam-se diferente a depender do método de preservação, desta forma este trabalho tem como finalidade estabelecer os meios ideais para viabilizar os fungos *P. teres* e *B. sorokiniana* por mais tempo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá com cinco isolados da coleção de fungos do laboratório, sendo 4885; 4890; 4892; 4893 e 4912 isolados de *Pyrenophora teres* e 4615; 4669; 4691; 5022 e 5033 isolados de *Bipolaris sorokiniana*. Os fungos foram previamente identificados molecularmente pela análise de sequências de DNA da região ITS-rDNA.

Preliminarmente, os fungos foram conduzidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro em meio de cultura de batata-dextrose-água (BDA), e meio de aveia. O meio de BDA foi preparado na proporção de 39g para cada 1 litro de água, enquanto para o meio de aveia utilizam-se 60g de aveia e 15g de ágar a cada 1 litro de água. As placas foram mantidas a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de 12 horas de luz e 12 de escuro, por sete dias, para serem utilizadas como inóculo.

Em seguida, foram realizadas as repicagens nos diferentes tipos de conservação. Para o método de repicagem periódica, realizou-se a transferência de material para uma nova placa a cada 30 dias. Para o método de óleo mineral, transferiu-se fragmentos de micélio a tubos de ensaio e após 5 dias, foram cobertos com óleo mineral esterilizado. No método Castellani, 20 discos de micélio de cada isolado foram transferidos a tubos de ensaio e cobertos com água destilada esterilizada. No congelamento foram preservados 20 discos de micélio em criotubos, cobertos com solução de glicerina e mantidos em freezer a -80°C . Por fim, foram preservados fragmentos de papel-filtro em microtubos de 1,5 mL em freezer a -80°C .

Os cinco métodos descritos acima representam os 5 tratamentos, e cada tratamento foi armazenado em triplicata. Após a repicagem, as placas foram mantidas em câmara de crescimento de microrganismos nas mesmas condições padronizadas de temperatura e luz. A variável resposta analisada foi o crescimento micelial após 7 dias de repicagem, medido em centímetros, e foi repetido 9 vezes, ou seja, ao longo de nove meses do projeto. Por fim, utilizando o software R, os dados coletados foram submetidos à análise descritiva. As medidas de crescimento micelial tomadas no último mês do experimento foram submetidas à de variância utilizando o teste F ($p \leq 0,05$). Quando houve significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise estatística das médias de crescimento micelial de *P. teres* após 280 dias de armazenamento, apresentada na Tabela 1, o método de preservação que apresentou maior crescimento micelial foi repicagem periódica. Entretanto, para o fungo *B. sorokiniana*, os melhores métodos, foram Castellani e Papel-filtro. O método de preservação em glicerina reduziu drasticamente o crescimento de ambos fungos.

Tabela 1. Crescimento micelial, em centímetros, dos fungos *Pyrenophora teres* e *Bipolaris sorokiniana* após armazenamento por nove meses em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Crescimento micelial (cm) de <i>P. teres</i>	Crescimento micelial (cm) de <i>B. sorokiniana</i>
1. Castellani	3,56 ab	8,07 a
2. Glicerina	0,41 c	0,01 c
3. Óleo Mineral	3,49 ab	3,11 b
4. Papel-filtro	3,22 b	8,07 a
5. Repicagem periódica	6,03 a	2,45 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

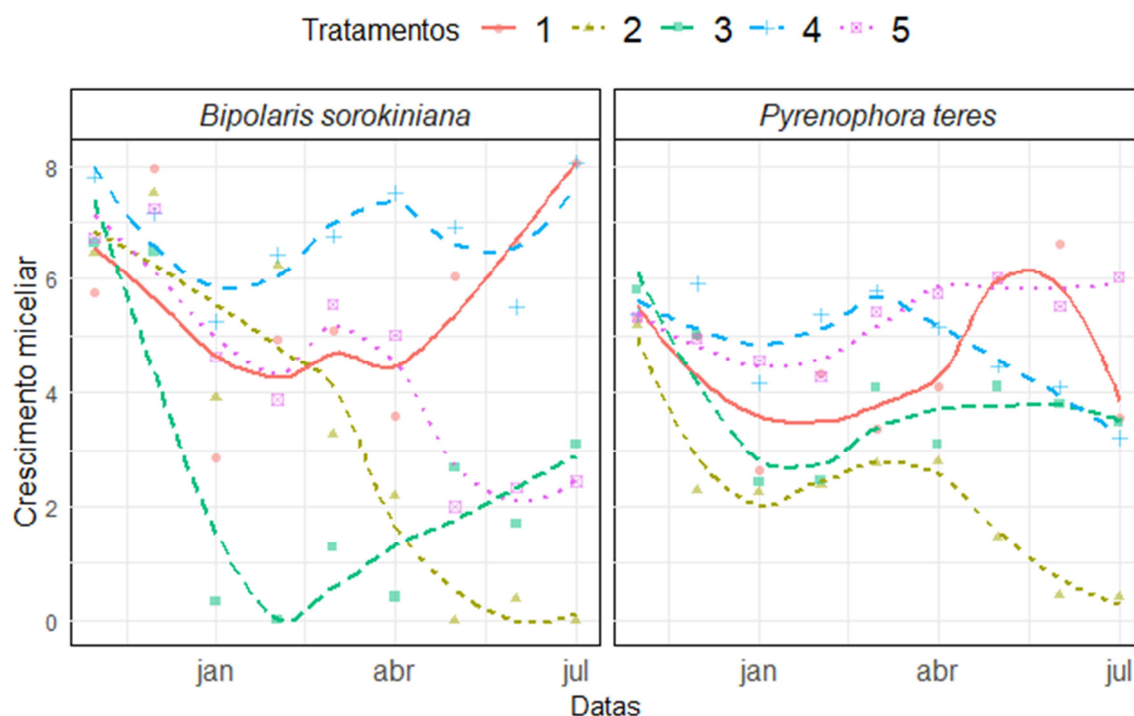


Figura 1 - Crescimento micelial (cm), durante 9 meses, de novembro a julho de 2024/25. Tratamento (Trat.) 1: Castellani; Trat. 2: Glicerina; Trat. 3: Óleo Mineral; Trat. 4: Papel-filtro; Trat. 5: Repicagem Periódica.

Ademais, é possível observar no gráfico da Figura 1, o comportamento do crescimento micelial submetido aos 5 tratamentos, no decorrer das 9 repetições, de novembro de 2024 a julho de 2025. Consoante aos resultados da análise estatística, as linhas de tendencia do gráfico demonstram que, para *B. sorokiniana*, os melhores tratamentos foram o 1 e o 4, sendo Castellani e Papel-filtro, respectivamente, e para *P. teres*, foi o tratamento 5, o método de Repicagem Periódica.

CONCLUSÕES

O método de preservação influenciou o crescimento micelial dos fungos. Os métodos de preservação de Castellani e papel-filtro para *Bipolaris sorokiniana* e de repicagem periódica para *Pyrenophora teres* proporcionaram melhor crescimento micelial em comparação com os demais métodos de preservação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, e o Grupo de Estudos em Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922p.

BELOTI, I. F. Viabilidade de fungos necrotróficos sob diferentes métodos de preservação. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. 2015.

GONÇALVES, R. C., ALFENAS, A. C., MÁFIA, R. G. Armazenamento de Microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G. (eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV. 2016. p. 94-105.

REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CEVADA, 32., 2019, Passo Fundo. Indicações técnicas para a produção de cevada cervejeira nas safras 2019 e 2020 / **XXXII Reunião Nacional de Pesquisa de Cevada**; Euclides Minella, editor técnico. Brasília: Embrapa, 2019. 112 p.