VIABILIDADE E EFICÁCIA DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE CURTO E LONGO PRAZO DE CULTURAS DOS FUNGOS *Pyrenophora teres* E *Bipolaris sorokiniana*

Julia Garcia Ribeiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Paula Rodrigues, Giovanna Seron (Coorientadora) e Dauri José Tessmann (Orientador). E-mail: djtessmann@gmail.com

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

Ciências Agrárias, Agronomia, Fitossanidade e Fitopatologia

Palavras-chave: Conservação; crescimento micelial; patogenicidade.

RESUMO

A manutenção de isolados fúngicos pode ser influenciada pelo método utilizado para sua conservação, podendo afetar a viabilidade e as características dos microrganismos ao longo do tempo. Neste trabalho, objetivou-se avaliar cinco métodos de preservação para culturas de *Pyrenophora teres* e *Bipolaris sorokiniana*, acompanhando o crescimento micelial dos isolados e a capacidade patogênica de um isolado de *B. sorokiniana*. Foram avaliados os métodos de repicagem periódica, óleo mineral, Castellani, glicerina e papel-filtro, utilizando cinco isolados de cada espécie. A viabilidade foi avaliada pelo crescimento micelial após sete dias de incubação, com avaliações realizadas a cada dois meses. Ao final, foi realizado um teste de patogenicidade com o isolado 4669, mantido pelos métodos de papel-filtro, repicagem periódica e Castellani, avaliando-se o grau de lesões em plantas de cevada sete dias após a inoculação. Na avaliação de crescimento micelial, o método de Castellani apresentou os maiores valores de crescimento micelial para *P. teres* (3,47 cm) e *B. sorokiniana* (5,33 cm). No teste de patogenicidade, os três métodos avaliados mantiveram a capacidade de causar lesões em plantas de cevada.

INTRODUÇÃO

A preservação de culturas fúngicas é importante para a pesquisa em Fitopatologia, pois permite manter os isolados viáveis e disponíveis para estudos posteriores, além de contribuir para a conservação de suas características biológicas. Entre os métodos utilizados estão a repicagem periódica, o óleo mineral, o método de Castellani, o congelamento em glicerina e o papel-filtro. A escolha do método pode variar de acordo com a espécie do fungo, o período de armazenamento e as condições disponíveis no laboratório (GONÇALVES et al., 2016).

Na cultura da cevada (*Hordeum vulgare* L.), os fungos *Pyrenophora teres* e *Bipolaris sorokiniana* são responsáveis pela mancha em rede e pela mancha marrom, respectivamente, doenças que podem afetar o desenvolvimento e a produtividade da

cultura. Esses patógenos também apresentam importância entre as doenças de cereais de inverno no Brasil (PICININI; FERNANDES, 1995).
A manutenção desses fungos em laboratório é necessária para a realização de estudos relacionados à identificação, epidemiologia e manejo das doenças. Entretanto, diferentes métodos de preservação podem influenciar a viabilidade e o comportamento dos isolados ao longo do tempo. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de cinco métodos de preservação de culturas de *P. teres* e *B. sorokiniana*, acompanhando a viabilidade dos isolados e, ao final, a capacidade de causar lesões em plantas de cevada.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), utilizando cinco isolados de *Pyrenophora teres* (4885, 4890, 4892, 4893 e 4912) e cinco isolados de *Bipolaris sorokiniana* (4615, 4669, 4691, 5022 e 5033), pertencentes à coleção de fungos do laboratório e previamente identificados por meio de análise molecular da região ITS do rDNA.
Foram avaliados cinco métodos de preservação, previamente estabelecidos em trabalhos anteriores, sendo: repicagem periódica, óleo mineral, método de Castellani, congelamento em glicerina e papel-filtro. Para a avaliação da viabilidade, os isolados foram repicados em placas de Petri de 90 mm contendo meio de cultura específico para cada espécie: *P. teres* foi cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA), enquanto *B. sorokiniana* foi cultivado em meio aveia-ágar. Após sete dias de incubação, mediu-se o diâmetro da colônia micelial com auxílio de paquímetro digital. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, e as avaliações foram realizadas a cada dois meses, com três repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
Ao final do período de preservação, foi realizado um teste de patogenicidade com o isolado 4669 de *B. sorokiniana*, proveniente dos métodos de preservação em papel-filtro, repicagem periódica e Castellani. Os métodos de preservação em óleo mineral e glicerina não foram incluídos neste teste, uma vez que não apresentaram crescimento micelial e/ou produção de esporos ao final da avaliação de crescimento micelial. O isolado foi inoculado em plantas de cevada da cultivar Imperatriz e, após sete dias, realizou-se a avaliação visual do grau de severidade das lesões desenvolvidas nas folhas, por meio de escala de notas de 1 (traços) a 9 (lesões necróticas grandes, com margem clorótica distinta e variados níveis de clorose difusa), de acordo com Fetch e Steffenson (1999). Foram avaliados seis vasos por tratamento, com cinco folhas avaliadas por vaso. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de crescimento micelial estão apresentados na Tabela 1. Para *P. teres*, o método de Castellani apresentou o maior crescimento (3,47 cm), enquanto

Glicerina, Óleo Mineral e Papel-filtro apresentaram os menores valores. Para *B. sorokiniana*, o método Castellani apresentou maior média de crescimento micelial (5,33 cm), e o método Glicerina não apresentou crescimento.

Tabela 1. Crescimento micelial, em centímetro, dos fungos *Pyrenophora teres* e *Bipolaris sorokiniana* submetidos aos diferentes métodos de preservação.

Tratamentos	Crescimento micelial (cm) de *P. teres*	Crescimento micelial (cm) de *B. sorokiniana*
Castellani	3,47 a	5,33 a
Glicerina	0,65 b	0,00 c
Óleo Mineral	0,46 b	0,76 bc
Papel-filtro	1,25 b	1,21 bc
Repicagem Periódica	1,73 ab	2,63 b

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

Na Figura 1, observa-se que o crescimento micelial variou ao longo das avaliações. De modo geral, Castellani apresentou os maiores valores para as duas espécies, enquanto glicerina apresentou os menores crescimentos.

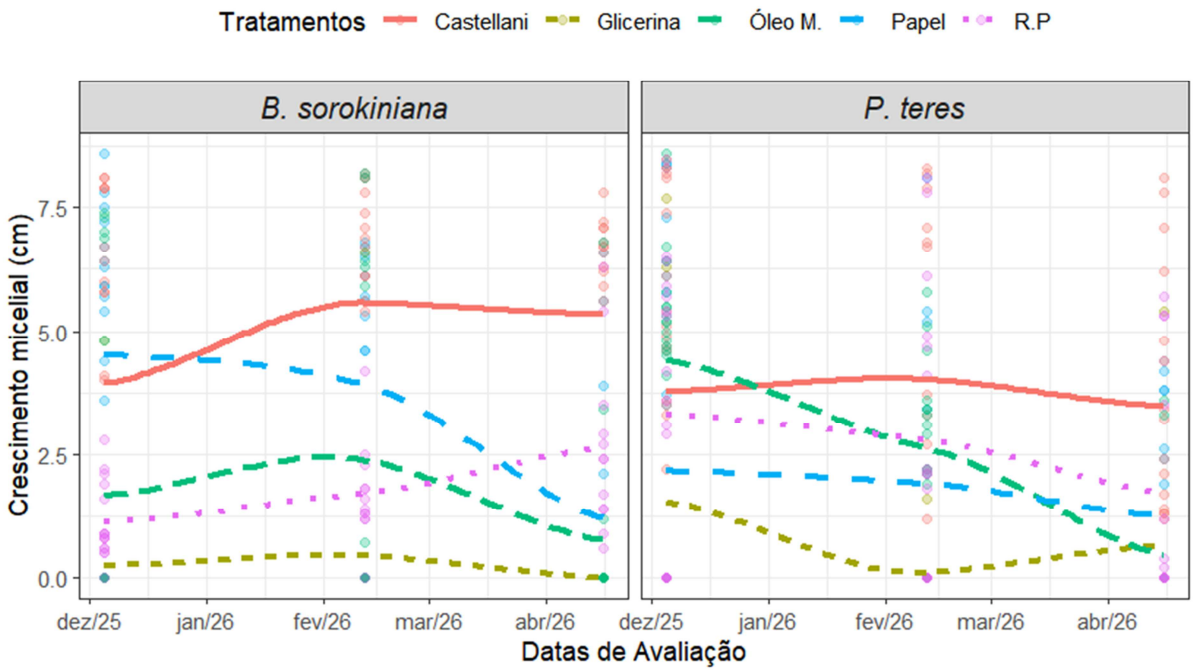


Figura 1 – Crescimento micelial, em centímetros, de dezembro a abril.

No teste de patogenicidade (Figura 2), observou-se que o isolado 4669 de *B. sorokiniana*, conservado nos três métodos de preservação avaliados, foi capaz de causar lesões em plantas de cevada sete dias após a inoculação. Os três métodos

permitiram a manutenção da capacidade patogênica do isolado, sem diferença significativa de agressividade entre eles (Tabelas 2 e 3).

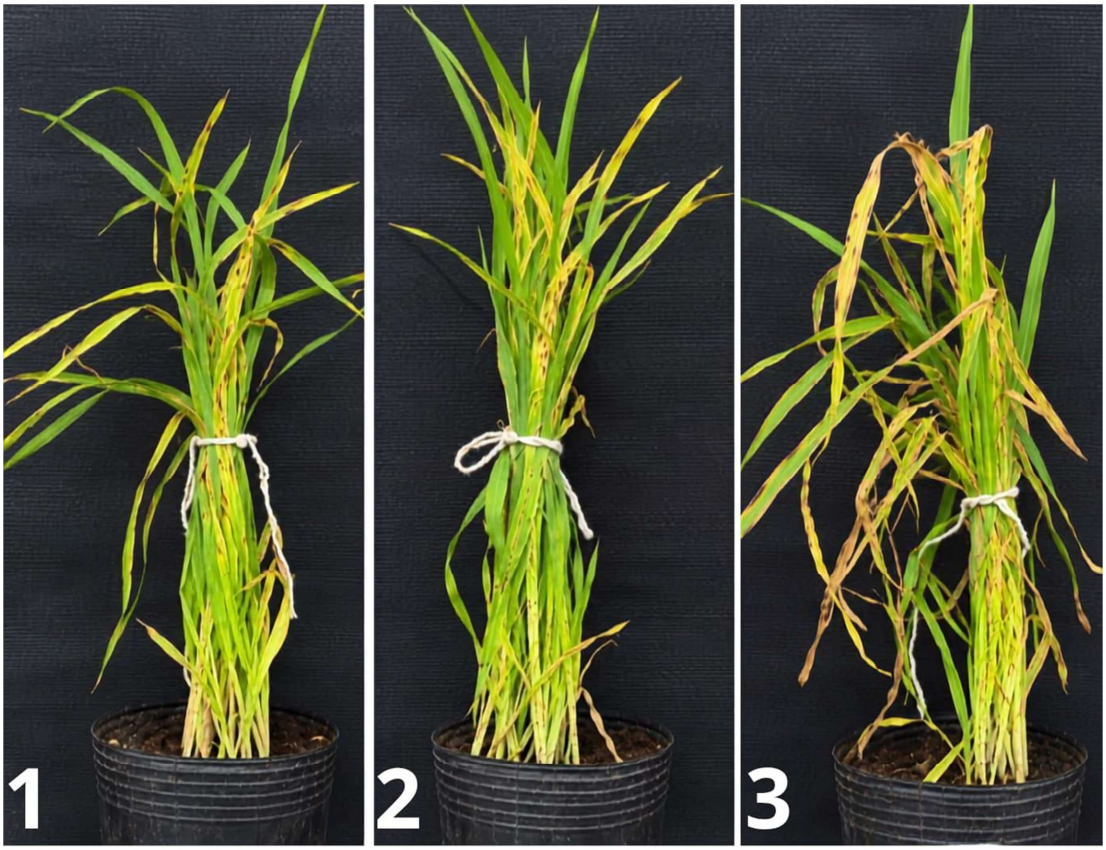


Figura 2 – Avaliação de patogenicidade de *B. sorokiniana* (isolado 4669) em plantas de cevada dos tratamentos: 1) Papel-filtro; 2) Repicagem periódica; 3) Castellani.

Tabela 2. Análise de variância das médias de severidade de mancha marrom, causada por *Bipolaris sorokiniana* (isolado 4669), em plantas de cevada da cultivar Imperatriz.

Variáveis	Grau de liberdade (GL)	Soma dos quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	*p*-valor
Tratamento	2	10,0044	5,0022	2,1459	0,1515^{ns}
Resíduo	15	34,9667	2,3311	-	-

^{ns} não significante a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Médias de severidade de mancha marrom, causada por *Bipolaris sorokiniana* (isolado 4669), em plantas de cevada da cultivar Imperatriz.

Tratamentos	Repetições						Média
Papel filtro	5,6	6	3,8	6,2	8,8	6	6,06
Repicagem Periódica	8	5,2	8	6,4	7,4	5,2	6,7
Castellani	9	8.6	9	5,2	9	6,4	7,86

Notas 1 (traços) a 9 (lesões necróticas grandes com margem clorótica distinta e variados níveis de clorose difusa), de acordo com a Figura 1 de Fetch e Steffenson (1999).

CONCLUSÕES

De maneira geral, os resultados indicam que o método de Castellani foi o que apresentou melhor desempenho para o crescimento micelial de *P. teres* e *B. sorokiniana.* Para a manutenção da patogenicidade do isolado 4669 de *B. sorokiniana*, não houve diferença significativa entre os métodos de preservação testados. Sendo assim, os métodos papel-filtro, repicagem periódica e Castellani, não diminuem a patogenicidade do isolado testado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária (FA) pela concessão da bolsa, e o Grupo de Estudos em Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

REFERÊNCIAS

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

FETCH JR, T.G.; STEFFENSON, B.J. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. **Plant Disease**, v. 83, n. 3, p. 213-217, 1999.

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.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Doenças em cereais de inverno: aspectos epidemiológicos e controle. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1995.

.