



**LARISSA SANTOS OLIVEIRA**

**MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE**  
*Colletotrichum lindemuthianum e Pseudocercospora*  
*griseola*

**LAVRAS - MG**

**2014**

**LARISSA SANTOS OLIVEIRA**

**MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE *Colletotrichum lindemuthianum* e  
*Pseudocercospora griseola***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dr. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Oliveira, Larissa Santos.

Métodos para preservação de *Colletotrichum lindemuthianum* e  
*Pseudocercospora griseola* / Larissa Santos Oliveira. – Lavras :  
UFLA, 2014.

51 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Elaine Aparecida de Souza.

Bibliografia.

1. Métodos de conservação. 2. Fungo. 3. Viabilidade. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**LARISSA SANTOS OLIVEIRA**

**MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE *Colletotrichum lindemuthianum* e  
*Pseudocercospora griseola***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de agosto de 2014.

Dr. José Airton Rodrigues Nunes      UFLA

Dra. Patricia Gomes Cardoso      UFLA

Dr. Elaine Aparecida de Souza  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2014**

*Aos meus pais, Marizete e Francisco Ruy (in memoriam); e a meu irmão  
Fellipe.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me iluminando.

Aos meus pais, Marizete e Francisco Ruy (*in memoriam*), por todo amor e confiança em mim depositados em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de aprendizagem.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora e orientadora Dra. Elaine Aparecida de Souza pela disponibilidade, orientação e ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos colegas de pós-graduação, pela convivência e amizade.

Aos companheiros de Laboratório da UFLA, pelo apoio e ensinamentos, especialmente, à Suellen e Rafael.

A minha família pelo amor e por todo apoio, especialmente meu irmão Fellipe e minha tia Nilzete.

Aos amigos da pós-graduação, em especial, Rita de Kássia e Nayara Norrene.

Ao meu namorado Lucas e toda sua família pela amizade e generosidade.

As minhas amigas Carina, Gabriela, Reizaluamar e Thamyres pela grande amizade e por toda confiança.

## RESUMO

Os microrganismos são utilizados em laboratórios de todo o mundo e são essenciais para muitos programas de pesquisa. Uma maneira eficaz de conservar microrganismos de interesse econômico é a preservação em coleções. A manutenção e preservação dessas culturas devem manter suas características originais, pureza e estabilidade. Vários métodos são utilizados e descritos na literatura, porém, nenhum que seja eficiente e recomendado para todos os fungos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os diferentes métodos de preservação em curto prazo, levando-se em consideração a manutenção das características originais de culturas de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. Foram utilizados nove isolados, sendo seis de *C. lindemuthianum* e três de *P. griseola*, que foram mantidos nos seguintes métodos de armazenamento durante 180 dias: Castellani, tiras de papel, sílica gel, congelamento utilizando glicerol a 5% e 10%, com micélio e suspensão de esporos. Foram conduzidos dois experimentos no delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas e fatorial. As seguintes características foram avaliadas: taxa de esporulação, porcentagem de germinação, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), diâmetro colonial (DC) e patogenicidade. Essas características são importantes para testar a eficiência de cada método de armazenamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas com as médias obtidas antes do armazenamento pelo teste t de Student, a 5% de significância. Os resultados obtidos mostraram que os métodos de Castellani e tiras de papel são mais eficientes para o armazenamento e manutenção de isolados de *C. lindemuthianum* em curto prazo, no entanto, os métodos de criopreservação de micélio em glicerol nas concentrações de 5% e 10% preservaram as características dos patógenos avaliados, sendo que a patogenicidade dos isolados de *C. lindemuthianum* não foi afetada pelos diferentes métodos de armazenamento. Todos os métodos mostraram-se eficientes na manutenção dos isolados de *P. griseola*.

Palavras-chave: Métodos de conservação. Fungo. Viabilidade.

## ABSTRACT

Microorganisms are used in laboratories around the world and are essential for many research programs. An effective form of conserving microorganisms of economic interest is the preservation in collections. The maintenance and preservation of these cultures must maintain their original characteristics, purity and stability. Many methods are used and described in literature, however, none are efficient and recommended for all fungi. The objective of this work was to evaluate the different short term preservation methods, considering the maintenance of the original characteristics of the *C. lindemuthianum* and *P. griseola*. We used nine isolates, being six of them *C. lindemuthianum* and three of them *P. griseola*, which were maintained in the following storage methods during 180 days: Castellani, paper strips, silica gel, freezing using 5% and 10% glycerol, with mycelium and spore suspension. We conducted two experiments in a completely randomized design in a subdivided plots and factorial scheme. The following characteristics were evaluated: sporulation rate, germination percentage, mycelia growth index (MGI), colony diameter (CD) and pathogenicity. These characteristics are important to test the efficiency of each storage method. The data obtained were submitted to analysis of variance and the means were compared to the means obtained before the storage by means of the t Student test at 5% of significance. The results obtained showed that the Castellani and paper strips methods are more efficient for the short term storage and maintenance of *C. lindemuthianum* isolates. However, the cryopreservation methods for mycelium in glycerol in the concentrations of 5% and 10% preserved the evaluated pathogen characteristics, being that the pathogenicity of the *C. lindemuthianum* isolates was not affected by the different storage methods. All methods showed efficiency in maintaining the *P. griseola* isolates.

Keywords: Conservation methods. Fungus. Viability.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolados de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>P. griseola</i> .....	23
Tabela 2	Estimativas da taxa de esporulação média das duas épocas de avaliação dos isolados de <i>C. lindemuthianum</i> nos diferentes métodos de preservação.....	32
Tabela 3	Estimativas da porcentagem média de conídios germinados das duas épocas de avaliação dos isolados de <i>C. lindemuthianum</i> avaliados nos diferentes métodos de preservação .....	33
Tabela 4	Estimativas do diâmetro colonial (mm) das duas épocas de avaliação de isolados de <i>C. lindemuthianum</i> nos diferentes métodos de preservação.....	35
Tabela 5	Estimativas do IVC (mm/dia) das duas épocas de avaliação de isolados de <i>C. lindemuthianum</i> nos diferentes métodos de preservação.....	36
Tabela 6	Estimativas da taxa de esporulação média das duas épocas de avaliação de isolados de <i>P. griseola</i> nos diferentes métodos de preservação.....	38
Tabela 7	Estimativas de germinação média dos conídios das duas épocas de avaliação dos isolados de <i>P. griseola</i> nos diferentes métodos de preservação.....	39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Antracnose do feijoeiro</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Mancha angular do feijoeiro</b> .....	13
<b>2.3</b>	<b>Preservação de fungos</b> .....	14
<b>2.4</b>	<b>Método de Castellani</b> .....	16
<b>2.5</b>	<b>Armazenamento por congelamento utilizando glicerol</b> .....	19
<b>2.6</b>	<b>Armazenamento em papel filtro</b> .....	20
<b>2.7</b>	<b>Armazenamento em sílica gel</b> .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>Local</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>Origem e manutenção dos isolados</b> .....	23
<b>3.3</b>	<b>Método de Castellani</b> .....	24
<b>3.4</b>	<b>Armazenamento por congelamento utilizando glicerol</b> .....	24
<b>3.5</b>	<b>Armazenamento em papel filtro</b> .....	25
<b>3.6</b>	<b>Armazenamento em sílica gel</b> .....	25
<b>3.7</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	26
<b>3.8</b>	<b>Características avaliadas</b> .....	26
<b>3.8.1</b>	<b>Taxa de esporulação</b> .....	27
<b>3.8.2</b>	<b>Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial</b> .....	27
<b>3.8.3</b>	<b>Taxa de germinação</b> .....	28
<b>3.8.4</b>	<b>Teste de patogenicidade</b> .....	29
<b>3.9</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	31
<b>4.1</b>	<b>Avaliação dos isolados de <i>C. lindemuthianum</i></b> .....	31
<b>4.1.1</b>	<b>Taxa de esporulação</b> .....	31
<b>4.1.2</b>	<b>Porcentagem de germinação</b> .....	31
<b>4.1.3</b>	<b>Diâmetro colonial e Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)</b> .....	33
<b>4.1.4</b>	<b>Patogenicidade</b> .....	36
<b>4.2</b>	<b>Avaliação dos isolados de <i>P. griseola</i></b> .....	37
<b>4.2.1</b>	<b>Taxa de esporulação e porcentagem de germinação</b> .....	37
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46
	<b>ANEXOS</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

A importância da manutenção e principalmente preservação de culturas advém da necessidade de se dispor do organismo ou espécime a qualquer momento, de forma que informações relevantes sobre os fitopatógenos de interesse fiquem disponíveis e sejam aplicadas no melhoramento de plantas visando resistência (FINATTI; APARECIDO, 2009). Para a obtenção destas coleções, é necessário estabelecer condições de cultivo que permitam o bom desenvolvimento destes microrganismos e sua manutenção (SANTOS et al., 2005). Além da sobrevivência do microrganismo, é necessário considerar a viabilidade e a escolha do método mais adequado.

Para a conservação e manutenção das coleções de culturas em laboratório, vários métodos são utilizados e descritos na literatura, porém, nenhum que seja eficiente e recomendado para diferentes grupos de fungos. O método mais eficiente será aquele que mantiver as características originais da cultura, mesmo após longos períodos de armazenamento (APARECIDO; EGYDIO; FIGUEIREDO, 2001).

A manutenção e preservação de coleções são fundamentais para assegurar um patrimônio de culturas e bancos genéticos, com atenção a morfologia, fisiologia, respostas celulares e teciduais, bem como sua associação à patogenicidade e infectividade, no caso de agentes patogênicos. Porém, isoladamente, nenhuma técnica tem sido aplicada com êxito para todos os fungos (ABD-ELSALAM et al., 2010).

As espécies *C. lindemuthianum* e *P. griseola* são importantes patógenos do feijoeiro, pois podem causar grandes perdas econômicas nessa cultura. Para pesquisas envolvendo estudos sobre a citologia, a genética, a patogenicidade e evolução destes microrganismos, é necessária a preservação dos mesmos em coleções.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os diferentes métodos de preservação em curto prazo, levando-se em consideração a manutenção das características originais de culturas de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Antracnose do feijoeiro

Essa é uma doença de distribuição bastante ampla, tendo sido encontrada em todo mundo. No Brasil ela ocorre em diversos estados, principalmente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003).

A antracnose do feijoeiro é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, na sua fase imperfeita. Nesta fase o fungo possui micélio septado e ramificado que, à medida que envelhece, muda a sua coloração de hialina para quase negra. Os conídios são hialinos, unicelulares e oblongos a cilíndricos, apresentam as extremidades arredondadas ou uma delas pontiaguda. Na germinação o conídio pode emitir de um a quatro tubos germinativos, frequentemente dois que formam apressórios em seus ápices por ocasião da penetração em seu hospedeiro. Em condições favoráveis, o patógeno esporula abundantemente formando uma massa de conídios de coloração rósea.

O patógeno penetra através da cutícula e da epiderme por meio de estruturas infectivas, dentre elas, hifas que se desenvolvem do apressório. Após a penetração, as hifas infectivas aumentam de tamanho e crescem entre as paredes celulares e o protoplasto, sem desenvolver sintomas por dois a quatro dias. Após alguns dias, as paredes são degradadas enzimaticamente levando ao surgimento de lesões aquosas que escurecem devido à alta concentração de taninos (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994).

Os sintomas da antracnose podem ser observados em toda parte aérea da planta, os mais comuns são lesões necróticas de coloração marrom escura nas nervuras na face inferior da folha, porém podem ser vistas também na face superior. O hipocótilo pode apresentar lesões, que vão desde o seu

estrangulamento até a morte da plântula. Ocorrem lesões também no caule, pecíolo, vagens e sementes (KIMATI et al., 2005).

Temperaturas entre 13 e 27°C, com ótimo a 21°C e umidade relativa acima de 91% favorecem o desenvolvimento da doença. O uso de sementes saudáveis e tratadas com fungicidas, rotação de culturas com plantas não hospedeiras e o uso de defensivos agrícolas são fundamentais no controle da doença. Entretanto, a utilização de cultivares resistentes é a medida de controle mais eficiente e econômica (CARBONELL et al., 2012).

## **2.2 Mancha angular do feijoeiro**

A mancha angular é uma das principais doenças do feijoeiro no Brasil, sendo causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc. Ferr.). Ocorre em regiões tropicais e subtropicais e já foi constatada nos Estados Unidos, Austrália, Europa e Ásia (MODA-CIRINO et al., 2012). Já foi considerada uma doença secundária, mas tornou-se importante devido a surtos que causaram danos na produção. Este patógeno sobrevive em sementes e nos restos de cultura e é disseminado pelo vento, respingos de chuva e partículas de solo (KIMATI et al., 2005).

A doença ocorre no caule, folha e vagem. As sementes podem ser infectadas através do hilo, reduzindo a germinação e o desenvolvimento das plântulas. Nas folhas primárias ocorrem lesões geralmente circulares, enquanto que nas folhas trifolioladas formam-se lesões de formato irregular, com o aparecimento de muitas lesões. Pode ocorrer a necrose das folhas e desfolha prematura. Nos ramos e pecíolos também podem ocorrer lesões que são alongadas e escuras (KIMATI et al., 2005).

*P. griseola* é um fungo de crescimento lento em meio de cultura, desenvolvendo-se em temperaturas de 8 a 28°C, o ótimo de temperatura para

germinação dos esporos situa-se entre 20 a 28°C, sendo que a infecção ocorre a temperaturas de 16 a 28°. Períodos longos de alta umidade são fundamentais para formação de lesões e também na formação de sinênios e esporos (KIMATI, 1980).

O controle da mancha angular pode ser conseguido por meio de pulverizações com fungicidas, práticas culturais e o uso de cultivares resistentes. No Brasil o controle químico tem sido utilizado por agricultores e esta ação determina o preço do feijão no mercado (SARTORATO, 2006). A mancha angular geralmente ocorre com maior severidade na safra da “seca”, portanto para a escolha da época de plantio devem-se levar em consideração alguns aspectos da doença na região, sendo importante observar as condições para condução do plantio. Conhecer a herança da resistência é importante para definir estratégias de melhoramento para controle da doença (MODA-CIRINO et al., 2012).

### **2.3 Preservação de fungos**

Os organismos vivos, as suas células ou suas partes (genomas, plasmídeos, cDNAs), são as bases das ciências da vida e da biotecnologia. Os microrganismos são cultivados e utilizados em laboratórios de todo o mundo e são essenciais para muitos programas de pesquisa. Estes materiais biológicos são usados para obtenção de dados para publicações e base de dados. Portanto devem estar disponíveis para confirmação de resultados e para novos estudos. Porém, é necessário que sejam mantidos sem alterações para garantir a sua reprodutibilidade (SMITH; RYAN, 2012).

Os fungos desempenham papéis vitais no funcionamento dos ecossistemas e também têm influência considerável sobre os seres humanos e suas atividades. Patógenos de plantas são especialmente importantes, uma vez

que têm grande influência negativa em muitos ecossistemas (ABD-ELSALAM et al., 2010).

Uma maneira eficaz de conservar microrganismos de interesse econômico é a preservação em coleções. A World Federation for Culture Collections (WFCCs) produz diretrizes que está atualmente em sua terceira edição e que orienta e estabelece critérios para criação e funcionamento de coleções de culturas, em que o principal objetivo é promover e apoiar o estabelecimento de coleções e serviços relacionados para garantir a longo prazo a perpetuação de importantes coleções (ABD-ELSALAM et al., 2010; SMITH; RYAN, 2012). A manutenção e preservação dessas culturas devem manter suas características originais, pureza, estabilidade (ABREU; TUTUNJI, 2004; SMITH; ONIONS, 1983) e integridade genética por períodos prolongados de tempo (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004; NYANGA et al., 2012). Portanto, isolar, cultivar e preservar microrganismos levou ao desenvolvimento e aprimoramento de inúmeras técnicas de manutenção. Essas culturas fúngicas, desde que estejam com suas características preservadas, serão amplamente utilizadas em pesquisas.

Diferentes espécies do mesmo gênero possuem longevidade muito variável, de tal forma, que esporos de alguns fungos permanecem viáveis durante anos, mas outros perdem seu poder germinativo em poucos meses. A frequência com que os subcultivos devem ser realizados depende em grande parte das particularidades do fungo, mas também se deve às condições externas, como temperatura ambiente (SMITH, 1963).

Existem algumas dificuldades em relação à conservação de culturas fúngicas. Manusear grandes quantidades de isolados repetidamente exige cuidado e o uso de técnicas apropriadas. Também é necessário um ambiente asséptico para evitar a contaminação e que informações importantes como, aspectos macroscópicos e microscópicos e taxa de crescimento sejam



devidamente registrados (SMITH, 1963). Todas as técnicas que permitirem o crescimento durante a preservação podem influenciar e permitir também a perda das propriedades originais (SMITH, 2002).

Assim a escolha do método depende das particularidades da espécie que será preservada, dos recursos disponíveis e do objetivo do trabalho (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004). A capacidade de recuperação de microrganismos viáveis norteia a eleição do método de manutenção, bem como as vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis.

Os métodos de preservação comumente usados são o uso de óleo mineral, água destilada esterilizada, uso de baixas temperaturas (nitrogênio líquido e congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), liofilização, armazenamento em sílica gel (SMITH; ONIONS, 1983). Porém os métodos de liofilização, nitrogênio líquido e congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  são técnicas que requerem equipamentos especiais, reposição do estoque de nitrogênio líquido rotineiramente, tornando-se técnicas mais onerosas. Já os métodos que envolvem o uso de água destilada esterilizada, sílica gel são mais econômicos (ELLIOTT, 2005). Entretanto, segundo Nakasone, Peterson e Jong (2004) não são considerados de conservação permanentes, apesar de serem métodos eficientes.

#### **2.4 Método de Castellani**

O armazenamento em água descrito por Castellani (1939) é um método bastante utilizado para armazenar isolados fúngicos e bacterianos. É uma técnica simples, de baixo custo e capaz de manter a viabilidade, pureza e patogenicidade de um grande número de isolados, sendo indicada na preservação de microrganismos sensíveis à baixa pressão osmótica de soluções hipotônicas. O método consiste na inoculação de frascos de vidro contendo água destilada esterilizada ou solução aquosa de NaCl 0,85%. Frequentemente colocam-se

cinco discos por frasco, contendo água destilada esterilizada até a metade da sua capacidade. Os frascos podem ser tampados com algodão, borracha ou papel-alumínio e mantidos em temperatura ambiente ou em temperaturas em torno de 10°C (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2007).

No armazenamento em água destilada esterilizada os esporos são mantidos viáveis e as culturas permanecem estáveis. Outra vantagem é que se trata de um método que não requer equipamentos dispendiosos, e por vedar os frascos diminuem as chances de contaminação, sendo que estas podem ocorrer durante a remoção do disco de ágar. Portanto, culturas reservas devem ser mantidas (SMITH; ONIONS, 1983). Este método tem se mostrado confiável para as espécies de fungos (GUTIÉRREZ-BARRANQUERO et al., 2012), sendo utilizado com sucesso em patógenos humanos e de plantas.

Resultados satisfatórios têm sido encontrados no que se refere à manutenção da viabilidade dos fungos, apresentando vantagens tais como, preservação das características originais da cultura por longo período, baixo custo, é um método simples e há necessidade de pequeno espaço físico (FINATTI; APARECIDO, 2009; PASSADOR et al., 2010). Além disso, a conservação à temperatura ambiente faz com que este método não necessite de energia elétrica para manutenção em longo prazo (ELLIOTT, 2005).

A viabilidade de alguns fungos tem sido relatada por até vinte anos com este método, apesar de alguns perderem essa viabilidade muito mais cedo (CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) dispõe de uma coleção de culturas fúngicas para controle biológico de fitopatógenos e de plantas daninhas. A preservação dos isolados dessa coleção é feita por meio dos métodos frequentemente usados, entre eles o que utiliza água destilada esterilizada (BRAÚNA, 2009).

Segundo Teramoto, Martins e Cunha (2011), o método de Castellani mostrou-se eficiente para a preservação de fitopatógenos mantendo a patogenicidade dos mesmos em um período de seis meses. Entre os métodos testados foi o que obteve maior taxa de esporulação dos isolados. Passador et al. (2010) mostrou que as culturas mantidas pelo método de Castellani mantiveram suas características morfológicas e fisiológicas intactas por longo período de tempo. Sendo então, um dos métodos mais recomendado para preservação das diferentes espécies fitopatogênicas.

Em um trabalho realizado por Elliott (2005), avaliando diferentes métodos de preservação, observou-se que o armazenamento em água destilada esterilizada não afetou a patogenicidade ou virulência dos isolados de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* 10 anos depois, sendo estas características essenciais para avaliar a eficiência dos métodos. Este método também tem sido utilizado com sucesso na manutenção de *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium bantianum*, *C. carrionii*, *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium nonatum*, *Penicillium* sp., and *Rhizopus* sp., por até um ano (DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005).

Castellani (1964) acredita que todos os patógenos fúngicos continuam viáveis e capazes de crescerem por pelo menos um ano e, possivelmente, possam ser mantidos indefinidamente se a água estéril for sempre repostada, anualmente. Sendo este método ideal para preservação de coleções de cultura em longo prazo.

No Commonwealth Mycological Institute (CMI) o método de preservação em água esterilizada tem sido utilizado desde que resultados evidenciaram a eficiência do método, no armazenamento de fungos patogênicos por até sete anos (SMITH; ONIONS, 1983).

## 2.5 Armazenamento por congelamento utilizando glicerol

Um dos métodos mais utilizados é a criopreservação, pois este permite que a maioria das culturas permaneça estável por um longo período, no entanto, tais processos causam estresses nos fungos devido às baixas temperaturas. Sendo o fungo exposto à solução hipertônica e formação de gelo intracelular, que está relacionado à redução da viabilidade (HUBÁLEK, 2003; MORRIS; SMITH; COULSON, 1988). Segundo Nakasone, Peterson e Jong (2004) a maioria dos protocolos que utilizam a criopreservação faz o uso de substâncias criopreservadoras como glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO). Estas substâncias são fundamentais para a sobrevivência de alguns microrganismos em determinados métodos de preservação (DAHMEN; STAUB; SCHWINN, 1982).

O glicerol tem sido amplamente utilizado na microbiologia em técnicas de preservação de microrganismos e resultados satisfatórios têm sido obtidos (DAHMEN; STAUB; SCHWINN, 1982; SMITH; ONIONS, 1983). A adição de 5 a 42% (v/v) de glicerol à suspensão de *Escherichia coli* em água permitiu a sobrevivência de longo prazo a uma temperatura de -20°C. Aplicado em concentrações de 2 a 55% (v/v), em uma média de 10% e também não diluído, ou na concentração de 50% (v/v), tem sido adotado para preservação de diversos fungos, bactérias e vírus (ANDRADE, 2008).

O método consiste na utilização de uma solução aquosa de glicerol a 15% como meio crioprotetor para conservação de bactérias. A redução do número de células viáveis e seleção de células adaptadas ao congelamento e ao descongelamento podem ser evitadas usando uma série de 200 ml de suspensão do microrganismo em tubos plásticos autoclaváveis de 500 ml. A cultura original é descongelada e repicada a partir de um único tubo que posteriormente é descartado (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2007).

Em trabalho realizado com *Trichoderma ssp.*, Silva (2011) utilizou 60 isolados monospóricos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica de São Paulo, conservados pelo método de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em glicerol 13% e em papel filtro. Diferentemente, Campos et al. (2004) avaliou e comparou a viabilidade de isolados fúngico das espécies *Monacrosporium sinensi* e *Monacrosporium appendiculatum* submetidos à criopreservação com o uso de glicerol 10% e com outras substâncias criopreservadoras e posteriormente avaliou sua capacidade predatória. Utilizando o glicerol observou-se que alguns isolados apresentaram um maior crescimento micelial, quando comparado com outros métodos. A atividade nematófaga *in vitro* também não foi alterada pelos diferentes métodos de preservação.

Elliott (2005) na avaliação de 12 formas de armazenamento de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* utilizou glicerol 40%, conservadas em diferentes temperaturas ( $-75^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Em geral todos os isolados mantiveram as suas características morfológicas para os diferentes métodos.

Com base nos resultados de diversos autores entre eles, Campos et al. (2004), Elliott (2005) e Silva (2011), observa-se uma grande variação nos protocolos com a finalidade de preservar coleções fúngicas, evidenciando que nenhuma técnica individual tem sido aplicada com sucesso para todos os fungos.

## **2.6 Armazenamento em papel filtro**

A idéia de usar papel filtro como um segundo suporte para micélios cultivados em placas com meio de cultivo surgiu a partir de observações onde se notou melhorias na sobrevivência dos microrganismos quando relacionados a substratos naturais, tais como, madeira, cereais, grãos, filtro de papel e tecidos de plantas (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004; STIELOW et al., 2012).

O método consiste na colonização de fragmentos de papel filtro ou papel-manteiga para armazenamento dos fungos. Para isso é necessário que o fungo cresça no meio de cultivo em placa de Petri contendo por cima pedaços de papel filtro ou papel-manteiga esterilizados. Após a colonização dos fragmentos de papel, estes são transferidos para placas de Petri esterilizadas e em um dessecador por até um mês, até que fiquem completamente secos e quebradiços. Posteriormente, os fragmentos contendo o micélio são transferidos para envelopes esterilizados que são armazenados à temperatura de 4°C. Esses fungos podem ficar viáveis por anos se forem mantidos na temperatura correta e bem secos. Para reativar as culturas é necessário que o fragmento de papel seja colocado em placas com o meio apropriado (SMITH; ONIONS, 1983).

Este método define o princípio de armazenamento por congelamento. Ainda não existe um protocolo único para todos os tipos de microrganismos, nem uma única temperatura de armazenagem, sendo que essas variam de -10°C a -100°C. Alguns fungos, bactérias e outros fitopatógenos podem ser congelados diretamente, sem um meio crioprotetor, com sucesso de conservação variável de até 3,5 anos.

Elliott (2005) testou 12 formas de conservação em longo prazo de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, entre elas o uso de papel filtro estéril na placa de Petri que depois de duas semanas no dessecador permaneceram armazenados em frascos de vidros esterilizados à temperatura ambiente. Ensaios de viabilidade foram conduzidos a 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 120 meses após a data inicial de armazenamento, sendo encontrados isolados viáveis após esses dez anos.

## 2.7 Armazenamento em sílica gel

Este método foi inicialmente desenvolvido por Perkins (1962) para as espécies de *Neurospora* ssp. Ele observou que os esporos protegidos por leite desnatado e armazenados em gel de sílica permanecem viáveis por 4-5 anos. A viabilidade após o armazenamento depende das peculiaridades dos fungos e do meio utilizado. As vantagens deste método é que ele inibe o metabolismo, evita o crescimento fúngico e é fácil recuperar as culturas. The Fungal Genetic Stock Center tem usado a técnica com sucesso desde 1962 para preservar diferentes espécies fúngicas (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004). Esse método tem provado sua eficiência no CABI Bioscience onde as culturas têm sido preservadas por 7-18 anos em gel de sílica (SMITH, 2002).

Este é também um método barato, simples, não requer aparelhagem sofisticada e a contaminação por ácaros é improvável (GRIVELL; JACKSON, 1969). Como desvantagem é inadequado para *Pythium*, *Phytophthora* e outro Oomycetes (SMITH; ONIONS, 1983). Também não foi obtido sucesso com esse método, para fungos que apresentam a parede dos esporos fina ou com apêndices (SMITH, 2002).

O armazenamento em baixas temperaturas pode aumentar o período de viabilidade dos fungos duas a três vezes quando comparados com a conservação à temperatura ambiente (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004). É um método eficaz para períodos relativamente longos e é menos trabalhoso que a liofilização, não sendo dependente de um fornecimento ininterrupto de gelo seco ou nitrogênio líquido (PERKINS, 1962).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças e em casa de vegetação do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### 3.2 Origem e manutenção dos isolados

Foram utilizados nove isolados, sendo seis de *C. lindemuthianum* e três de *P. griseola*, pertencentes à micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*

Raça	Isolado	Espécie	Procedência
65	LV 145	<i>C. lindemuthianum</i>	Lambari
65	LV 134	<i>C. lindemuthianum</i>	Lambari
65	LV 238	<i>C. lindemuthianum</i>	Lambari
81	LV 44	<i>C. lindemuthianum</i>	-
81	LV 227	<i>C. lindemuthianum</i>	-
89	LV 228	<i>C. lindemuthianum</i>	-
63.63	Psg-1	<i>P. griseola</i>	Patos de Minas
63.63	Psg-2	<i>P. griseola</i>	Lambari
63.63	Psg-3	<i>P. griseola</i>	Patos de Minas

Os isolados de *P. griseola* foram repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, para os isolados de *C. lindemuthianum* o meio



de cultura utilizado foi o M3. Em seguida, os isolados foram armazenados em câmara de crescimento tipo BOD à temperatura de 24 e 22° C, respectivamente. Após a colonização das placas e tubos, foram mantidos em geladeira para utilização dos fungos nas avaliações.

### **3.3 Método de Castellani**

Foi realizado o armazenamento em frascos de vidro, cada um contendo metade de sua capacidade de água destilada (CASTELLANI, 1939). Estes foram vedados com tampas de borracha, autoclavados a 121°C sob 1 atm por 30 minutos. Posteriormente, foram colocados cinco discos da cultura por frasco que foram então armazenados à temperatura ambiente (GONÇALVES, ALFENAS, MAFIA, 2007).

### **3.4 Armazenamento por congelamento utilizando glicerol**

Foram preparadas soluções de glicerol nas concentrações de 5% e 10% e esterilizadas. Discos de micélio foram retirados das placas e dos tubos e depositados na solução de glicerol em tubos plásticos autoclaváveis. Para armazenamento da solução de esporos, 2 a 3 mL da solução de glicerol foram adicionados à placa. Posteriormente, realizou-se a raspagem com uma alça até soltarem os esporos que foram depositados nos tubos plásticos autoclaváveis e vedados com parafilme. Os tubos foram armazenados no ultrafreezer a -80°C (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2007).

Os isolados foram mantidos em:

- a) Solução de esporos em glicerol a 5%
- b) Solução de esporos em glicerol a 10%

- c) Discos de micélio em glicerol a 5%
- d) Discos de micélio em glicerol a 10%

### **3.5 Armazenamento em papel filtro**

Papel filtro esterilizado foi colocado sobre as placas de Petri contendo meio de cultura e depois foram transferidos os discos de micélio para três pontos da placa (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2007). As placas foram mantidas à temperatura ambiente para colonização das tiras de papel. Após a colonização, com o auxílio de uma pinça, retiraram-se as tiras de papel que foram mantidas em dessecador por 7-15 dias, em placas de Petri esterilizadas. As tiras de papel foram transferidas para tubos, contendo sílica gel, que foram vedados com parafilme e armazenados na geladeira.

### **3.6 Armazenamento em sílica gel**

Tubos de 2 ml com rosca foram preenchidos até a metade da sua capacidade com grânulos de sílica gel e esterilizados por aquecimento em estufa a 160° C, durante 2 horas. Uma solução de 7,5% de leite desnatado foi autoclavada. Adicionou-se 2 a 3 ml de leite desnatado esterilizado à cultura e raspou-se a superfície com uma alça esterilizada para soltar os esporos. Adicionou-se 0,5 mL da suspensão de leite de esporos a um frasco refrigerado esterilizado contendo sílica gel. Posteriormente, adicionou-se a suspensão lentamente e uniformemente. Agitou-se o frasco durante e após o processo de adição da suspensão. As tampas dos frascos foram seladas com parafilme e depois armazenados em ultrafreezer à temperatura de -80°C (PERKINS, 1962).

### 3.7 Delineamento experimental

Foram conduzidos dois experimentos separadamente, sendo um para os isolados de *C. lindemuthianum* e outro para os isolados de *P. griseola*. Ambos os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema de parcela subdividida, sendo os tratamentos primários expostos em um fatorial cruzado 6x7 para os isolados de *C. lindemuthianum*, ou seja, seis isolados e sete métodos de armazenamento, e o tempo de armazenamento como um tratamento secundário. Para os isolados de *P. griseola*, os tratamentos primários foram expostos em um fatorial cruzado 3x7 ou seja, três isolados e sete métodos de armazenamento. A parcela foi constituída por uma placa de Petri. Foram avaliados seis isolados de *C. lindemuthianum*, sete métodos de preservação e dois tempos de armazenamento (90 e 180 dias), totalizando-se 84 tratamentos. No experimento de avaliação de *P. griseola* foram avaliados três isolados, os mesmos sete métodos de preservação citados anteriormente e dois tempos de armazenamento (90 e 180 dias), totalizando-se 42 tratamentos.

### 3.8 Características avaliadas

Os caracteres descritos a seguir foram avaliados antes do armazenamento dos isolados nos diferentes métodos de conservação. Os métodos de preservação foram avaliados, por meio destes caracteres, em intervalos de três meses. Os tempos de avaliação foram aos três e seis meses após o armazenamento, como já mencionado, utilizando-se cada um dos métodos de preservação citados no item 3.3. Essas características são importantes para testar a eficiência de cada método de armazenamento.

### 3.8.1 Taxa de esporulação

Para avaliação da taxa de esporulação, tubos de ensaio contendo vagem de feijoeiro foram inoculados com os seis isolados *C. lindemuthianum* e incubados a 22°C por um período de 14 dias no escuro. Para obtenção da suspensão de esporos, foram adicionados 3mL de água estéril no tubo, raspadas e posteriormente filtradas usando Miracloth estéril. Uma alíquota (10µL) foi retirada de cada suspensão original e realizou-se a leitura da concentração de esporos em câmara de Neubauer segundo metodologia descrita por Dias et al. (2005).

Para induzir a esporulação, os isolados de *P. griseola* foram cultivados em meio folha-dextrose-ágar (SILVEIRA, 1967) e mantidos a 24°C na incubadora (BOD) por um período de oito dias, com fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, o inóculo foi preparado pela adição de 5-10 mL de água destilada estéril em cada placa e procedendo a raspagem da superfície com o auxílio de pincel, para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada utilizando uma camada de gaze, para remoção dos fragmentos miceliais. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer.

### 3.8.2 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial

Para a avaliação do IVCM e do diâmetro colonial dos isolados de *C. lindemuthianum* discos de micélio de 6 mm de diâmetro foram colocados no centro de placas de Petri contendo meio M3 e mantidas à 22°C e mantidas no escuro. O IVCM foi avaliado por meio da leitura das médias em milímetros entre os dois diâmetros ortogonais da colônia em intervalos de 24 horas durante 15 dias e estimado utilizando-se a expressão apresentada por Paulert (2005). O

diâmetro colonial foi determinado medindo-se os diâmetros ortogonais das colônias em milímetros após 15 dias de incubação.

### 3.8.3 Taxa de germinação

Para avaliação dos isolados de *C. lindemuthianum* suspensões de conídios na concentração de  $1,2 \times 10^6$  foram obtidas como descrito no item 2.5.1, a partir de tubos de ensaio contendo vagem de feijoeiro com 14 dias de incubação. 200  $\mu$ L das suspensões de conídios foram gotejados em uma célula em lâmina de cultivo de oito células (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubados a 22°C no escuro por 24 horas. Amostras foram examinadas após a adição do corante Calcofluor White na concentração 0.12 M por 3-4 minutos, em temperatura ambiente usando-se um microscópio de epifluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1). A fluorescência foi detectada a 420/70 nm usando a objetiva de 40x. Imagens do microscópio foram capturadas utilizando-se o software Axiovision Zeiss e processadas no software Image J. Para a avaliação da porcentagem de germinação, foram avaliados 100 conídios por repetição por meio de microscopia de luz. Os conídios que apresentaram tubo germinativo de tamanho igual ou maior do que o menor diâmetro do conídio foi considerado germinado.

Para os isolados de *P. griseola* a avaliação da porcentagem de germinação foi semelhante à descrita anteriormente. Porém, a concentração de conídios foi ajustada para  $2 \times 10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  e incubadas por uma hora a 24°C.

### 3.8.4 Teste de patogenicidade

Os isolados retirados aos 180 dias foram avaliados quanto à patogenicidade, uma vez que não se sabe se os métodos de armazenamento reduzem a agressividade do isolado. No teste de patogenicidade, foram utilizados os seis isolados de *C. lindemuthianum*, que foram crescidos em tubos contendo vagens estéreis por 15 dias a 22 °C. A suspensão de esporos foi obtida por meio da raspagem dos tubos com água destilada estéril e filtradas com Miracloth e ajustadas à concentração de  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml. Foi conduzido um experimento no delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com dois tratamentos (cultivares suscetíveis Pérola e Majestoso) com duas repetições para cada isolado de cada método. Cada parcela foi constituída por nove plantas. As duas cultivares foram semeadas em bandejas contendo substrato Multiplanta. As plântulas foram inoculadas de acordo com a metodologia descrita por Pinto (2012). Como as cultivares são altamente suscetíveis, foi avaliada a presença ou não dos sintomas da antracnose do feijoeiro.

### 3.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. O modelo estatístico utilizado para análise foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + g_i + m_k + gm_{ik} + e_{(ik)j} + t_l + gt_{il} + mt_{kl} + gmt_{ikl} + e_{(ijkl)}$$

em que;

$Y_{ijkl}$ : observação do isolado  $i$ , dentro da repetição  $j$ , na época  $l$ , que recebeu o método  $k$ ;

$\mu$ : constante associada às observações;  
 $a_k$ : efeito do isolado i;  
 $m_k$ : efeito do método k  
 $ma_{ik}$ : efeito da interação do isolado i com o método k;  
 $e_{(ik)j}$ : erro experimental;  
 $t_l$ : efeito da época l;  
 $ms_{il}$ : efeito da interação do isolado i com a época l;  
 $mt_{kl}$ : efeito da interação do método k com a época l;  
 $gmt_{ikl}$ : efeito da interação do isolado i com o método k com a época l;  
 $e_{ijkl}$ : erro experimental

As médias obtidas das análises de variância foram comparadas com as médias obtidas antes do armazenamento pelo teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade, para todas as características avaliadas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico R.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Avaliação dos isolados de *C. lindemuthianum***

Nas análises de variância realizadas para todas as características avaliadas, todas as fontes de variação foram significativas (Tabelas 1A). Portanto, a interação isolados x métodos x épocas foi desdobrada em métodos dentro de isolado dentro de época em todos os casos. As médias não apresentadas são resultado da contaminação dos isolados.

#### **4.1.1 Taxa de esporulação**

As médias obtidas na avaliação da taxa de esporulação são apresentadas na Tabela 2 e observa-se que a maioria dos métodos mostrou-se eficiente para manutenção dos isolados aos 90 e 180 dias de armazenamento.

#### **4.1.2 Porcentagem de germinação**

As médias obtidas na avaliação da porcentagem de germinação de esporos são apresentadas na Tabela 3. Os métodos de Castellani e tiras de papel mostraram-se eficientes na preservação dessa característica. No entanto, os métodos que utilizam glicerol e sílica gel apresentaram diferenças significativas quando comparados com a testemunha, sendo que aos 180 dias de armazenamento esses métodos mostraram-se menos eficientes para a manutenção desses isolados.



Tabela 2 Estimativas da taxa de esporulação média das duas épocas de avaliação dos isolados de *C. lindemuthianum* nos diferentes métodos de preservação

Isolados: Métodos	Esporulação (x 10 <sup>7</sup> conídios/ml) 90 dias					
	LV227	LV44	LV134	LV238	LV228	LV145
Castellani	1,81	1,80	1,74	3,78	2,93	2,65
Tiras de Papel	2,47	1,59	1,75	3,34	2,99	3,82
Sílica Gel	1,71	1,37	1,48	-	1,59	3,01
Glim 5%	1,81	1,38	1,55	3,05	1,61	2,37
Glim 10%	2,03	1,51	1,86	2,83	1,62	3,05
Glie 5%	1,76	1,46	1,64	1,42	-	2,51
Glie 10%	1,54	1,49	1,57	1,49	-	2,61
	Esporulação (x 10 <sup>7</sup> conídios/ml) 180 dias					
Castellani	1,97	1,55	2,92	3,19	1,78	3,92
Tiras de Papel	1,96	1,37	1,95	3,06	2,48	3,33
Sílica Gel	0,65	1,57	1,34	2,00	0,91	2,54
Glim 5%	1,42	1,48	1,77	3,26	-	1,77
Glim 10%	1,97	1,71	1,97	3,17	-	2,83
Glie 5%	-	1,96	2,03	1,79	1,39	2,60
Glie 10%	-	1,23	1,60	1,33	-	2,03
Médias antes do armazenamento	1,85	1,56	1,86	3,85	2,45	2,64

<sup>1</sup> Discos de micélio em glicerol (Glim), suspensão de esporos em glicerol (Glie).

Tabela 3 Estimativas da porcentagem média de conídios germinados das duas épocas de avaliação dos isolados de *C. lindemuthianum* avaliados nos diferentes métodos de preservação

Isolados: Métodos	Germinação (%) 90 dias					
	LV227	LV44	LV134	LV238	LV228	LV145
Castellani	35,00	33,33	34,00	29,66	37,00	33,66
Tiras de Papel	19,66	24,66	32,00	27,33	33,33	28,66
Sílica Gel	13,33*	19,33	13,66*	-	9,66*	22,66
Glim 5%	17,00*	24,33	18,66	6,00*	4,00*	13,33*
Glim 10%	19,66	15,66	22,00	11,00*	7,66*	4,33*
Glie 5%	3,66*	10,33*	5,30*	15,66*	-	11,66*
Glie 10%	8,66*	2,66*	20,33	3,00*	-	9,33*
	Germinação (%) 180 dias					
Castellani	33,66	28,00	31,00	19,33	32,66	12,66
Tiras de Papel	13,66*	17,33	23,00	27,33	27,33	24,33
Sílica Gel	-	15,33	14,00*	4,33*	2,66*	14,33*
Glim 5%	11,30*	15,00	14,33*	4,66*	-	14,66*
Glim 10%	15,00*	10,66*	12,00*	16,00*	-	6,66*
Glie 5%	-	3,33*	7,00*	16,00*	9,33*	7,66*
Glie 10%	-	2,66*	13,00*	10,33*	4,00*	9,00*
Médias antes do armazenamento	38,00	32,66	38,00	38,00	37,00	37,33

<sup>1</sup> Discos de micélio em glicerol (Glim), suspensão de esporos em glicerol (Glie).

#### 4.1.3 Diâmetro colonial e Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

As médias obtidas para a avaliação do diâmetro colonial e IVCM são apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Para a característica diâmetro colonial, todos os métodos mostraram-se eficientes na sua capacidade de manutenção, aos 90 e 180 dias de armazenamento (Tabela 4). Porém para a característica IVCM, apenas o método de Castellani e tiras de papel mostrou-se eficiente nas duas épocas de armazenamento para todos os isolados. Na avaliação aos 90 dias, os demais métodos também mantiveram as características originais, com exceção, do isolado LV134, nos métodos que utiliza glicerol e sílica gel. Já na avaliação aos 180 dias de armazenamento observa-se que os métodos que utilizam suspensão de esporos em glicerol, independente de sua concentração, apresentaram diferenças significativas das testemunhas para a maioria dos isolados (Tabela 5).

Tabela 4 Estimativas do diâmetro colonial (mm) das duas épocas de avaliação de isolados de *C. lindemuthianum* nos diferentes métodos de preservação

Isolados: Métodos	DC (mm) 90 dias					
	LV227	LV44	LV134	LV238	LV228	LV145
Castellani	6,06	6,03	7,23	5,90	6,16	5,70
Tiras de Papel	5,86	6,26	6,50	6,06	6,23	6,46
Sílica Gel	5,86	5,10	5,63	-	6,03	6,30
Glim 5%	6,06	5,76	5,56	5,60	5,83	6,06
Glim 10%	5,90	5,76	5,56	5,60	5,76	6,30
Glie 5%	5,46	5,53	5,40	5,13	-	5,13
Glie 10%	5,03	5,03	5,56	5,66	-	5,66
	DC (mm) 180 dias					
Castellani	6,73	6,30	6,43	5,63	5,66	6,46
Tiras de Papel	6,46	5,93	5,96	6,76	6,50	6,00
Sílica Gel	-	5,43	4,90	5,83	-	4,90
Glim 5%	5,50	6,40	6,06	5,76	-	5,60
Glim 10%	5,30	5,93	5,90	5,46	-	5,86
Glie 5%	-	5,53	5,33	4,86	-	5,36
Glie 10%	-	5,03	5,70	4,46	-	5,80
Médias antes do armazenamento	6,8	6,6	7,0	6,4	5,9	6,6

<sup>1</sup> Discos de micélio em glicerol (Glim), suspensão de esporos em glicerol (Glie).

Tabela 5 Estimativas do IVCM (mm/dia) das duas épocas de avaliação de isolados de *C. lindemuthianum* nos diferentes métodos de preservação

Isolados: Métodos	IVCM (mm/dia) 90 dias					
	LV227	LV44	LV134	LV238	LV228	LV145
Castellani	0,37	0,36	0,44	0,36	0,37	0,34
Tiras de Papel	0,34	0,38	0,40	0,37	0,38	0,39
Sílica Gel	0,35	0,30	0,34*	-	0,36	0,38
Glim 5%	0,37	0,35	0,33*	0,34	0,35	0,37
Glim 10%	0,36	0,35	0,33*	0,34	0,35	0,38
Glie 5%	0,33	0,33	0,32*	0,30	-	0,30
Glie 10%	0,30*	0,30	0,33*	0,34	-	0,34
	IVCM (mm/dia) 180 dias					
Castellani	0,42	0,38	0,39	0,34	0,35	0,39
Tiras de Papel	0,39	0,36	0,36	0,41	0,40	0,36
Sílica Gel	-	0,32	0,29*	0,35	-	0,29
Glim 5%	0,33	0,39	0,37	0,35	-	0,34
Glim 10%	0,32	0,36	0,36	0,33	-	0,35
Glie 5%	-	0,33	0,32*	0,29*	-	0,32
Glie 10%	-	0,30	0,34*	0,26*	0,37	0,35
Médias antes do armazenamento	0,41	0,37	0,46	0,41	0,36	0,40

<sup>1</sup> Discos de micélio em glicerol (Glim), suspensão de esporos em glicerol (Glie).

#### 4.1.4 Patogenicidade

Na avaliação da patogenicidade foram utilizadas duas cultivares suscetíveis (Pérola e Majestoso). Observou-se que os isolados de *C.*

*lindemuthianum* avaliados nos diferentes métodos de preservação mantiveram sua capacidade patogênica, causando os sintomas de antracnose em todas as plantas e em alguns casos, ocorrendo a morte das plantas.

#### **4.2 Avaliação dos isolados de *P. griseola***

Nas análises de variância realizadas para todas as características avaliadas todas as fontes de variação foram significativas (Tabelas 2A). Portanto, a interação isolados x métodos x épocas foi desdobrada em métodos dentro de isolado dentro de época em todos os casos.

##### **4.2.1 Taxa de esporulação e porcentagem de germinação**

As médias obtidas na avaliação da taxa de esporulação e porcentagem de germinação são apresentadas nas Tabelas 6 e 7 respectivamente. As médias não apresentadas são resultado da contaminação dos isolados. Observa-se que todos os métodos de preservação foram eficientes na manutenção destas características para os isolados de *P. griseola*, aos 90 e 180 dias de armazenamento.

Tabela 6 Estimativas da taxa de esporulação média das duas épocas de avaliação de isolados de *P. griseola* nos diferentes métodos de preservação

Métodos :Isolados	Esporulação (x 10 <sup>4</sup> conídios/ml) 90 dias		
	Pgs-1	Pgs-2	Pgs-3
Castellani	2,25	2,34	1,65
Tiras de Papel	2,1	2,40	1,91
Sílica Gel	2,01	2,04	-
Glim 5%	2,33	1,87	1,75
Glim 10%	2,09	2,18	1,98
Glie 5%	1,86	2,12	-
Glie 10%	1,92	2,02	-
	Esporulação (x 10 <sup>4</sup> conídios/ml) 180 dias		
Castellani	2,22	2,18	1,51
Tiras de Papel	1,96	1,65	1,45
Sílica Gel	1,38	1,50	-
Glim 5%	1,76	1,34	-
Glim 10%	1,59	1,27	1,43
Glie 5%	0,99	-	-
Glie 10%	1,19	-	-
Médias antes do armazenamento	2,15	2,10	1,99

<sup>1</sup> Discos de micélio em glicerol (Glim), suspensão de esporos em glicerol (Glie).

Tabela 7 Estimativas de germinação média dos conídios das duas épocas de avaliação dos isolados de *P. griseola* nos diferentes métodos de preservação

Métodos :Isolados	Germinação (%) 90 dias		
	Pgs-1	Pgs-2	Pgs-3
Castellani	9,33	15,00	6,33
Tiras de Papel	16,33	13,66	7,00
Sílica Gel	8,33	9,00	-
Glim 5%	12,33	19,66	7,33
Glim 10%	11,66	16,33	8,00
Glie 5%	9,66	11,33	-
Glie 10%	5,00	6,33	0,00
	Germinação (%) 180 dias		
Castellani	7,33	13,33	6,00
Tiras de Papel	13,00	9,66	5,00
Sílica Gel	5,33	4,33	-
Glim 5%	10,00	14,00	-
Glim 10%	10,66	13,00	-
Glie 5%	5,33	-	-
Glie 10%	3,00	-	-
Médias antes do armazenamento	12,66	12,33	10,33

<sup>1</sup> Discos de micélio em glicerol (Glim), suspensão de esporos em glicerol (Glie).



## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliados diferentes métodos de armazenamento de isolados de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, patógenos do feijoeiro. A escolha adequada de métodos de preservação desses patógenos é fundamental para que pesquisas envolvendo estudos sobre a citologia, a genética, a patogenicidade e evolução possam ser realizadas.

Os resultados deste trabalho evidenciaram de um modo geral, que os métodos que apresentaram melhor desempenho na manutenção dos isolados de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*, aos 90 e 180 dias foram o método de Castellani e tiras de papel. Em contrapartida, os métodos que utilizaram suspensão de esporos mostraram-se menos eficientes que aqueles que utilizaram discos de micélio para preservação em glicerol. Os resultados das características analisadas demonstraram que o processo de preservação não teve influência sobre a patogenicidade dos isolados, após os 180 dias de armazenamento.

Resultados semelhantes foram relatados por Diogo, Sarpieri e Pires (2005), em que as características morfológicas e microscópicas avaliadas de 43 espécies de fungos foram mantidas após conservação em água destilada por um período de 12 meses, mantendo sua viabilidade e capacidade de esporulação. Trabalhos similares evidenciam que a conservação de fungos pelo método de Castellani é um método barato e prático para manutenção de micotecas (CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989), e não se observou alterações nas características morfológicas e patológicas do fungo (DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005; ELLIOTT, 2005).

Resultados relatados por Borman et al. (2006) mostraram para 45 espécies de fungos patogênicos, o método de Castellani, a viabilidade dos isolados reduziu com o passar dos anos, ocorrendo também alterações morfológicas e perda das características originais. Assim, embora o método de

Castellani continue de fácil execução e simples, é necessário que, sempre que possível, este seja complementado por um segundo método de armazenamento para aumentar as chances de manutenção da viabilidade em longo prazo. Foi observado que a viabilidade dos isolados foi alta no primeiro ano de armazenamento (100%), porém houve uma pequena redução na viabilidade destes isolados em períodos longos de armazenamento (até 20 anos). Estes resultados justificam a necessidade da busca por métodos de armazenamento que mantenham a viabilidade dos isolados em longo prazo.

Analisando-se os resultados obtidos no presente estudo, pode-se notar que ocorreu uma redução nas estimativas das características avaliadas após o armazenamento, porém essa redução não interferiu na viabilidade dos isolados, para os diferentes métodos de preservação. A análise destas características é importante para avaliar a eficiência dos métodos de armazenamento (CAMPOS et al., 2004).

Elliott (2005) avaliou cinco linhagens de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* em 12 métodos de armazenamento. Dentre os métodos utilizados, dois utilizavam glicerol 40% em temperaturas diferentes (-75°C e -20°C), dois utilizavam água destilada em diferentes temperaturas e outros dois, papel filtro. A virulência de *G. graminis* em plantas de trigo foi mantida, mesmo após 10 anos de armazenamento. Em geral todos os isolados mantiveram as suas características morfológicas para os diferentes métodos. Sendo que o método que utilizou a solução de glicerol armazenada a -75°C mostrou-se ineficiente para recuperação de alguns isolados.

A criopreservação foi utilizada por Chvostová, Nerud e Homolka (1995) para testar a viabilidade de 232 cepas de basidiomicetos, utilizando glicerol a 10% como crioprotetor. O resultado mostrou que 164 linhagens sobreviveram ao processo, indicando que o processo de criopreservação é complexo e deve ser aperfeiçoado para uma maior sobrevivência das linhagens. Entre os agentes

crioprotetores utilizados em coleções de microrganismos para fungos filamentosos o mais comum é o glicerol (HUBÁLEK, 2003). O glicerol é uma substância altamente permeável e foi inicialmente aplicada em 1913 em suspensões de *Escherichia coli*, em variadas concentrações (5% a 42%), que permitiu mantê-las viáveis por seis meses à temperatura de -20°C (AGUIAR et al., 2012). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as concentrações de glicerol não influenciaram na eficiência dos métodos de armazenamento. Assim fica evidente a necessidade de padronizar protocolos de criopreservação de microrganismos quanto à concentração de glicerol. Várias coleções foram mantidas com sucesso utilizando esse método, porém com variação na concentração de glicerol.

Existem dois tipos de agentes crioprotetores: aqueles que adentram a célula e protegem o ambiente intracelular e outros que protegem a célula externamente. Glicerol e dimetil-sulfóxido (DMSO) são mais comumente usados no primeiro caso. Sacarose, lactose, glicose, manitol, sorbitol, dextran, pirrolidona e poliglicol são usados no segundo caso. Desta forma, as células podem ser preservadas por um tempo indefinido e recuperar suas funções normais quando forem devidamente descongeladas (ABREU; TUTUNJI, 2004). No presente estudo notou-se um melhor resultado para o armazenamento utilizando-se os discos de micélio em glicerol, em detrimento do método que utilizou a suspensão de esporos. Uma possível explicação para este resultado é a capacidade de penetração do glicerol nas células. Assim, o glicerol, provavelmente, penetrou com maior facilidade nas hifas (micélio), protegendo-as dos danos do congelamento, ao contrário dos esporos que teriam ficado desprotegidos em função da pouca penetração do glicerol em suas paredes. Portanto, a espessura/composição da parede teria influenciado na ação do crioprotetor, resultando em uma maior eficiência para os métodos que utilizaram os discos de micélio.

Há relatos mostrando que o armazenamento em sílica gel é eficaz para períodos relativamente longos e é menos trabalhoso, sendo eficiente especialmente para culturas que são vigorosas no processo de esporulação (BROCKMAN; SERRES, 1962; WILSON, 1986; WINDELS; BURNES; KOMMEDAHL, 1988). No presente trabalho, ficou evidenciado que a eficiência deste método é dependente de uma alta taxa de esporulação da espécie.

Segundo Windels, Burnes e Kommedahl (1988) muitos isolados de *Fusarium* spp. foram satisfatoriamente preservados pelo método de sílica gel por cinco anos, evidenciando que este método é eficiente para o armazenamento a longo prazo. O autor relata que em *F. graminearum* o método que utiliza sílica gel somente tornou-se eficiente quando as suspensões de esporos foram analisadas microscopicamente antes de proceder ao armazenamento. Para aquelas suspensões que apresentavam altas taxas de esporulação a viabilidade foi de 97%, indicando que a taxa de esporulação seria uma condição essencial para esse método de armazenamento em algumas espécies. Outra desvantagem deste método é que alguns fungos podem perder a capacidade de esporulação, sendo esta uma característica importante para disseminação e sobrevivência de fungos em condições ambientais.

Pérez-García et al. (2006) preservou com sucesso conídios de *Podosphaera fusca*. A viabilidade dos isolados após os diferentes períodos de armazenamento foi avaliada pela taxa de germinação de conídios. O dessecamento dos conídios pareceu protegê-los dos danos do congelamento, aumentando a viabilidade das culturas. Assim os resultados mostraram que a dessecação dos conídios, reduzindo o teor de água dos esporos, foi benéfica contra os danos do congelamento.

Com o objetivo de desenvolver um protocolo de criopreservação eficiente para armazenamento de fungos em longo prazo, Crahay et al. (2013) testou dois métodos de preservação, utilizando palha e outro utilizando ágar em

solução de glicerol a 10%, ambos com a mesma solução crioprotetora e as mesmas condições de congelamento e descongelamento, foram armazenadas em freezer. Para os dois protocolos ocorreram altas taxas de viabilidade

Diante dos resultados obtidos na preservação de *C. lindemuthianum* e *P. griseola* nas metodologias que envolvem a criopreservação, principalmente aquelas que utilizam suspensões de esporos, uma alternativa para aumentar a eficiência das mesmas seria alterar as condições de congelamento. Inicialmente, dever-se-ia resfriar a suspensão de conídios a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente acondicioná-la a  $-80^{\circ}\text{C}$  no ultrafreezer (CHVOSTOVÁ; NERUD; HOMOLKA, 1995).

De um modo geral, os métodos que utilizaram os discos de micélio apresentaram uma melhor recuperação, o que pode estar ligado ao crioprotetor proteger mais o micélio do que os esporos, como já foi mencionado.

## 6 CONCLUSÃO

- a) Os métodos de Castellani e tiras de papel são mais eficientes para o armazenamento e manutenção de isolados de *C. lindemuthianum* a curto prazo.
- b) Os métodos de criopreservação de suspensão de esporos em glicerol nas concentrações de 5% e 10% não são recomendados para o armazenamento de *C. lindemuthianum*.
- c) A patogenicidade dos isolados de *C. lindemuthianum* não foi afetada pelos diferentes métodos de armazenamento.
- d) Os métodos de preservação avaliados mostraram-se eficientes a curto prazo para conservação de isolados de *P. griseola*.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. A. et al. Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 45, n. 1, p. 21-32, Dec. 2010.
- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de micro-organismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2004.
- AGUIAR, T. D. F. et al. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 80-93, 2012.
- ANDRADE, M. L. **Avaliação de formas de preparação de estoques de trabalho na preservação de *Streptomyces clavuligerus* visando a produção de ácido clavulânico**. 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, n. 4, p. 421-424, 2001.
- BORMAN, A. M. et al. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, n. 6, p. 361-368, June 2006.
- BRAÚNA, L. M. et al. **Efeito de quatro diferentes métodos de preservação sobre o crescimento e a viabilidade de fungos agentes de controle biológico**. Brasília: CENARGEN, 2009. 21 p.
- BROCKMAN, H. E.; SERRES, F. J. de. Viability of *Neurospora* conidia from stock cultures on silica gel. **Neurospora Newsletter**, Orlando, v. 1, p. 8-9, 1962.
- CAMPOS, K. A. et al. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 465-469, 2004.
- CAPRILES, C. H. de; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 106, n. 3, p. 73-80, 1989.

CARBONELL, S. A. M. et al. Antracnose. In: CARBONELL, S. A. M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; WENDLAND, A. (Ed.). **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG Zona da Mata, 2012. p. 15-40.

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

CASTELLANI, A. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **Institute of Tropical Medicine**, Antwerpen, v. 44, p. 217-220, 1964.

CHVOSTOVÁ, V.; NERUD, F.; HOMOLKA, L. Viability of wood-inhabiting *basidiomycetes* following cryogenic preservation. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 40, n. 2, p. 193-197, 1995.

CRAHAY, C. et al. Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. **Fungal Biology**, New York, v. 117, n. 2, p. 103-111, Feb. 2013.

DAHMEN, H.; STAUB, T.; SCHWINN, F. J. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 73, p. 241-246, 1982.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.

DIAS, M. D. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* ssp. e isolados de *Coffea arábica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 545-552, maio/jun. 2005.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Fungi preservation in distilled water. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasília, v. 80, n. 6, p. 591-594, nov./dez. 2005.

ELLIOTT, M. L. Survival, growth and pathogenicity of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* with different methods of long-term storage. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 4, p. 901-907, 2005.



FINATTI, D.; APARECIDO, C. C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 715-720, 2009.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 91-102.

GRIVELL, A. R.; JACKSON, J. R. Microbial culture preservation with Silica Gel. **Journal of General Microbiology**, London, v. 58, p. 423-425, 1969.

GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A. et al. Sclerotization as a long-term preservation method for *Rosellinia necatrix* strains. **Mycoscience**, Tokyo, v. 53, n. 6, p. 460-465, Nov. 2012.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, San Diego, v. 46, n. 3, p. 205-229, June 2003.

KIMATI, A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, 318 p.

KIMATI, A. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

MODA-CIRINO, V. et al. Mancha-angular. In: PAULA JUNIOR, T. J.; WENDLAND, A. (Ed.). **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG Zona da Mata, 2012. p. 157-170.

MORRIS, G. J.; SMITH, D.; COULSON, G. E. A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. **Journal of General Microbiology**, London, v. 134, p. 2897-2906, 1988.

NAKASONE, K. K.; PETERSON, A. W.; JONG, S. Preservation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (Ed.). **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic, 2004. p. 37-47.

NYANGA, L. K. et al. Yeasts preservation: alternatives for lyophilisation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 3239-3244, Nov. 2012.

PASSADOR, M. M. et al. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 51-55, 2010.

PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. 2005. 107 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PÉREZ-GARCÍA, A. et al. Long-term preservation of *Podosphaera fusca* using sílica gel. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 2, p. 190-192, 2006.

PERKINS, D. D. Preservation of neurospora stock culture with anhydrouf silica gel. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 8, p. 591-594, 1962.

PINTO, J. M. A. V. **Variabilidade fenotípica de isolados sexuais e assexuais de lesões de antracnose do feijoeiro**. 2012. 95 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorre em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, jun. 1994.

SANTOS, J. et al. Crescimento e esporulação de três raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) sob quatro condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 493-495, 2005.

SARTORATO, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha angular. **Fitopatologia Brasileira**, Santo Antônio de Goiás, v. 31, n. 2, p. 192-194, mar./abr. 2006.

SILVA, V. N. **Promoção do crescimento e proteção sistêmica em pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* por *Trichoderma* ssp.** 2011. 102 p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2011.

SILVEIRA, G. A. **Evaluación de la resistencia de frijol a la mancha angular:** algunos aspectos fisiológicos de *Isariopsis griseola* Sacc. y patogenicidad de algunas cepas colectadas en Costa Rica. 1967. 60 f. Disertación (Maestría en Ciencias Agrícolas) - Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas da OEA, Turrialba, 1967.

SMITH, D. **Culturing, preservation and maintenance of fungi:** plant pathologist's pocketbook. Boston: CABI Bioscience, 2002. 485 p.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi.** Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1983. 132 p.

SMITH, D.; RYAN, M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2012, May 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22629202>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

SMITH, G. **Introducción a la micología industrial.** Zaragoza: Acribia, 1963. 443 p.

STIELOW, J. B. et al. Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. **Mycologia**, New York, v. 104, n. 1, p. 324-330, 2012.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; CUNHA, M. G. Avaliação de métodos para preservação de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, p. 296-298, 2011.

WILSON, C. FGSC culture preservation methods. **Fungal Genetics Newsletter**, Manhattan, v. 33, p. 47-48, 1986.

WINDELS, C. E.; BURNES, P. M.; KOMMEDAHL, T. Five-year preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 78, p. 107-109, 1988.

## ANEXOS

**ANEXO A -** Tabelas com os resumos das análises de variância para as características avaliadas dos isolados de *C. lindemuthianum* e *P. griseola*

Tabela1A Resumo da análise de variância para os dados de germinação, IVCM, DC e esporulação dos isolados de *C. lindemuthianum*, envolvendo métodos, isolados e épocas.

FV	GL	QM			
		GERMINAÇÃO	IVCM	DC	ESPORULAÇÃO
Isolados (I)	5	295***	0,10310***	28,843***	14,060***
Métodos (M)	6	3439***	0,10370***	26,044***	8,352***
I X M	30	178***	0,01446***	3,905***	1,439***
Resíduo	84	12	0,00019	0,048	0,130
Época (E)	1	884,1***	0,05042***	14,096***	0,8622**
I X E	5	36,7**	0,04080***	11,404***	1,5776***
M X E	6	27,1*	0,01293***	3,268***	0,3577**
I X M X E	30	33,9***	0,04480***	11,803***	0,9928***
Resíduo	84	9,1	0,00019	0,050	0,1155

Tabela2A Resumo da análise de variância para os dados de germinação e esporulação dos isolados de *P. griseola*, envolvendo métodos, isolados e épocas.

FV	GL	QM	
		Esporulação	Germinação
Isolados (I)	2	454,4***	8,561***
Métodos (M)	6	175,1***	3,366***
I X M	12	43,3***	0,641***
Erro a	42	10,4	0,027
Época (E)	1	198,13***	9,375***
I X E	2	78,77***	1,990***
M X E	6	10,15	0,330***
I X M X E	12	30,48***	1,039***
Erro b	42	6,06	0,037