

## VIABILIDADE DO USO DAS TÉCNICAS NA PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO *IN VITRO* DE *Mycosphaerella fijiensis* AGENTE CAUSAL DA SIGATOKA-NEGRA DA BANANEIRA

Camila de Paiva NOGUEIRA<sup>1</sup>, Rogério Eiji HANADA<sup>2</sup>, Rosalee Albuquerque COELHO NETTO<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista FAPEAM/INPA; <sup>2</sup>Co-Orientador CPPF/INPA; <sup>3</sup>Orientadora CPCA /INPA.

### Introdução

A sigatoka-negra é uma doença foliar da bananeira (*Musa* sp.) causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cujo estágio anamórfico ou assexuado é o fungo *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton. É considerada a doença mais destrutiva da bananeira, devido a grande agressividade de seu agente etiológico e da suscetibilidade das cultivares de bananeira.

O *Mycosphaerella fijiensis* produz dois tipos de esporos: os conídios, ou esporos da fase assexuada e os ascósporos, ou esporos da fase sexuada. Ambos os esporos são considerados propágulos de disseminação e estruturas de sobrevivência do fungo (Gasparotto *et al.* 2006). A fase ascospórica ou sexuada constitui o inóculo primário, permite a sobrevivência do patógeno, principalmente quando as condições ambientais são desfavoráveis (períodos frios e de baixa umidade do ar). Por outro lado, a fase conidial ou assexuada, que constitui o inóculo secundário, garante a rápida multiplicação do patógeno em menor espaço de tempo e em maior quantidade. Isso resulta em maior velocidade de desenvolvimento da doença que, de modo geral, ocorre nos períodos mais quentes e com umidade relativa mais elevada (Pereira *et al.* 1999 apud Fioravanzo *et al.* 2005).

O crescimento de *M. fijiensis* em meio de cultura é lento e a produção de conídios é baixa. A produção de conídios depende de vários fatores como temperatura, luminosidade, composição do meio, aeração e da idade das colônias (Etebu *et al.* 2005; Hanada *et al.* 2002, Gasparotto *et al.* 2006). A ausência de conídios e ascósporos diminui a viabilidade do fungo *in vitro* e restringe os métodos de preservação que podem ser utilizados.

Coleções de microrganismos fitopatogênicos podem fornecer isolados para uso em estudos de variabilidade, de patogenicidade, na avaliação de resistência a doenças, no diagnóstico, no controle de doenças. A manutenção da viabilidade e da virulência de *M. fijiensis in vitro* é fundamental para desenvolver estudos relacionados à patogênese, a variabilidade do patógeno, a resistência da hospedeira e ao manejo da doença. Isolados de *M. fijiensis* perdem rapidamente a viabilidade durante o armazenamento em meio de cultura com repicagens periódicas (Hanada 2010, informação pessoal). Vários métodos de armazenamento podem ser utilizados para preservar esses isolados e todos têm vantagens e desvantagens. A manutenção de isolados em meio de cultura com transferências periódicas exige trabalho intensivo e, apesar de ser um método simples, o risco de perda das culturas é alto, seja por contaminação, infestação por ácaros, seleção de partes não típicas da cultura, entre outros (Smith e Onions 1983). Outros métodos de armazenamento como em água destilada, óleo mineral ou liofilização, podem permitir a manutenção de microrganismos por 20 anos ou mais e quase todas as grandes coleções de fungos utilizam alguns desses métodos de preservação (Figueiredo 2001). O presente trabalho teve por objetivos avaliar a preservação e a manutenção de *M. fijiensis* em coleção utilizando diferentes métodos visando a manutenção da viabilidade e estabilidade genética aos isolados.

### Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Coordenação de Pesquisas em Ciência Agrônoma do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/CPCA), em Manaus. Para realização do trabalho foram utilizados 43 isolados de *Mycosphaerella fijiensis*, pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA mantidos em meio BDA e obtidos a partir de isolamento direto de material proveniente de diferentes Estados do Brasil.

Esses isolados foram cultivados em meio de cultura BDA em placas de Petri em estufa incubadora a 25 °C, no escuro, por 10 dias e, em seguida, submetidos a luz negra por cinco dias e logo após o crescimento foram repicados para tubos de ensaio com meio BDA inclinado. Os isolados viáveis foram preservados utilizando os seguintes métodos:

**Meio de cultura** – As culturas foram cultivadas em meio de cultura BDA inclinado em tubos de ensaio. Após a incubação a 25 °C, no escuro, por 10 dias e, sob luz negra por cinco dias, foram mantidos em geladeira (5 °C). Foram preparados dois tubos para cada isolado.

**Meio de cultura recoberto com óleo mineral** – Os fungos foram cultivados como descrito para o método anterior e cobertos com óleo mineral esterilizado (autoclave a 121 °C, por 15 minutos, repetido por dois dias consecutivos, e estufa a 70 °C por 24h). Os tubos com as colônias foram mantidos em estufa a 27 °C. Foram preparados dois tubos para cada isolado.

**Baixa temperatura Método I** – Os fungos foram cultivados em BDA e pedaços das colônias foram transferidas para tubos de criopreservação (2 mL de capacidade), contendo 1 mL de solução de glicerol a 10% e mantidos a -18 °C. Foram preparados três tubos para cada isolado.

**Baixa temperatura Método II** - Os fungos foram cultivadas em BDA e 0,5 mL de suspensão de conídios e micélio preparada com leite desnatado a 10% foi transferido para tubos de criopreservação contendo 0,5 mL de glicerol 10%. Os tubos foram mantidos a -18 °C. Foram preparados três tubos para cada isolado.

**Baixa temperatura Método III** - Os fungos foram cultivados em BDA e pedaços das colônias foram transferidas para tubos de criopreservação (2 mL de capacidade), contendo 0,5 mL de solução de glicerol a 70% e 0,5 mL de caldo de batata e dextrose (PDB) e mantidos a -18 °C. Foram preparados três tubos para cada isolado.

**Água destilada** – Os fungos foram cultivados em meio BDA e pedaços das colônias foram transferidos para frascos de vidro (10 mL) contendo e 5 mL de água destilada esterilizada. Os frascos foram lacrados com tampas de borracha e mantidos a temperatura ambiente (25°C). Para esse método foram feitas três repetições.

**Sílica gel** – Os fungos foram cultivados em BDA e discos de papel de filtro esterilizados foram imersos em uma suspensão de conídios e micélio preparada com leite desnatado a 10%. Os discos foram transferidos para frascos de vidro (10 mL) com metade da sua capacidade preenchida com sílica gel desidratada. Os frascos foram lacrados com tampas de borracha e mantidos a temperatura ambiente (25 °C). Foram preparados três tubos para cada isolado.

#### **Efeito da temperatura na viabilidade de isolados de *M. fijiensis* armazenados em meio de cultura:**

Três isolados de *M. fijiensis* foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA em três repetições. Após 15 dias de cultivo, os tubos foram mantidos nas temperaturas de 10 °C, 25 °C, 27 °C e 31 °C.

#### **Resultados e discussão**

Na coleção de Fitopatógenos de Interesse Agrossilvicultural, 20 isolados foram preservados nos diversos métodos, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Métodos de Armazenamento e Quantidade de Isolados de *Mycosphaerella fijiensis* preservados.

<b>Métodos de Preservação</b>	<b>Quantidade preservada</b>
BDA	20
BDA + Óleo	14
Água	17
Óleo Mineral	17
Baixa Temperatura I	17
Baixa Temperatura II	9
Baixa Temperatura III	14
Sílica Gel	12

Após o período que variou de um há seis meses foram realizadas as avaliações da sobrevivência dos fungos aos métodos de preservação. Dos isolados preservados foram escolhidos três e retirados dos métodos de preservação em que estavam foram transferidos para placas de Petri e colocados em

B.O.D. (27 °C) por 15 dias para crescer. A partir desse crescimento avaliou-se a eficiência do método para preservação de *M. fijiensis*.

Os três isolados avaliados mantidos pelos métodos de BDA, BDA recoberto por óleo mineral, Água, Óleo mineral, Baixa temperatura I, Baixa temperatura III se mostraram 100% viáveis. Já nos métodos Baixa temperatura II e Sílica gel a sobrevivência dos isolados não foi total.

De acordo com Figueiredo (2007) a preservação em água é o mais vantajoso para manter em laboratório, diversos gêneros e espécies de fungos. Além de ser um método aplicável a grande diversidade de gêneros, é prático, simples, de baixo custo e evita alterações morfológicas e/ou fisiológicas que poderiam vir a ocorrer nas culturas, como resultado da preservação por repicagens periódicas.

Avaliou-se também o efeito de quatro temperaturas sobre isolados de *M. fijiensis*. Após o período de um mês e sete dias esses isolados foram transferidos para placas de Petri com meio BDA e colocados para crescer durante 15 dias, durante esses 15 dias avaliou-se o crescimento desses isolados. O resultado dessa avaliação foi que a melhor temperatura para o isolado é de 31 °C. Como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Efeito da Temperatura sobre quatro isolados de *Mycosphaerella fijiensis*

Temperaturas °C	Isolados				Sobrevivência %
	8	100	1929	2053	
10	66,67	100	0	66,67	58,34
25	33,34	66,67	100	66,67	66,67
27	33,34	33,34	66,67	100	58,34
31	33,34	100	100	100	83,34

## Conclusão

A *Mycosphaerella fijiensis* responde de maneira diferente aos métodos de preservação sendo assim deve-se preservar em vários métodos diferentes para manter esse isolado em coleção. Os melhores métodos para a preservação de *M. fijiensis in vitro* são BDA, BDA recoberto por óleo mineral, Água, Óleo mineral, Baixa temperatura I, Baixa temperatura III.

## Referências

- Etebu, E.; Pasberg-Gauhi, F.; Daniel-Kalio, A. 2005. Effect of light and sealing pattern on sporulation and growth of *Mycosphaerella fijiensis*. *InfoMusa* 14:24-25,
- Figueiredo, M.B. 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico* 63: 73-82.
- Figueiredo, M.B. 2007. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de castellani (água destilada) e liofilização. *Biológico* 69: 5-8.
- Fioravanco, J.C.; Paiva, M.C. 2005. Sigatoka – Negra da bananeira. *Revista Brasileira de Agrociência*, 11: 135-141.
- Gasparotto, L., Pereira, J.C.R., Hanada, R.E., Montorroyos, A.V.V. 2006. Sigatoka-negra da bananeira. Manaus, 177p.
- Hanada, R. E., Gasparotto, L., Pereira, J.C.R. 2002. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, 27:170-173.
- Pereira, L.V.; Cordeiro, Z.J.M.; Figueira, A.dos R. et al. 1999. Doenças da bananeira. *Informe Agropecuário*, 20: 37-47.
- Smith, D.; Onions, H.S. 1983. *The preservation and maintenance of living fungi*. Norwich, England, Commonwealth Mycological Institute. 51 pp.