

CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE UMA MICOTECA NO IFMS CAMPUS NAVIRAÍ E USO DE MÉTODOS DE CONTROLE *IN VITRO*

Victoria da Silva Rosseto¹, Cristiana Maia de Oliveira¹

¹Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – Naviraí-MS

victoria.rosseto@estudante.ifms.edu.br, cristiana.oliveira@ifms.edu.br

Resumo

Micoteca é uma coleção de culturas de fungos aos quais são identificados e preservados. Sua criação permite a utilização em práticas de ensino e pesquisa e no desenvolvimento do conhecimento. Saber os patógenos e as doenças causadas por eles, permitem identificar qual a melhor forma de manejo. Assim, o presente estudo tem como objetivo identificar fungos causadores de doenças em plantas, preservar e criar uma micoteca no IFMS *campus* Naviraí. Além disso, objetivou-se selecionar patógenos e identificar a melhor forma controle entre produtos químicos, biológicos e naturais.

Palavras-chave: Fungos. Controle. Fitopatologia.

Introdução

Uma das maiores preocupações atuais dentro da agronomia, é a fitossanidade das plantas de modo geral. Com isso, ao longo dos anos passou-se a desenvolver-se uma ciência voltada para os estudos de doenças em plantas em todos os aspectos, desde o diagnóstico até o controle. Essa ciência estuda os microrganismos, como fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e viróides (Camargo, 2013).

Os fungos possuem grande importância, pois compõem um dos maiores grupos de microrganismos. Ademais, são organismos que se nutrem a partir da secreção de enzimas extracelulares, responsáveis pela digestão dos compostos orgânicos e já que são decompositores naturais da matéria orgânica. Existem espécies de fungos fitopatogênicos, provocando graves doenças em espécies vegetais de importância econômica, levando à grandes perdas na produção agrícola (Felex, 2019).

Sabendo-se que os fungos são causadores de 70 a 80% das doenças em plantas, compreende-se a importância de estudar. Ademais, a criação das micotecas ou coleção de fungos tem como intuito coletar, preservar e disponibilizar os materiais para aqueles que possuem interesse com a finalidade de estudos científicos, didáticos, etc. (Abreu e Tutunji, 2004).

Os fungos são o maior grupo de organismos fitopatogênicos no mundo e esses causam diversas doenças em praticamente todos os tipos de plantas, muitas delas sendo de grande produção e de alta importância econômica. Os fungos causam alterações nos processos fisiológicos das plantas e esses distúrbios podem acarretar na morte dos tecidos e consequentemente da planta (Morandi e Junior, 2009).

Sabendo-se disso, a identificação de fungos fitopatogênicos apresenta-se de extrema importância, já que é necessário conhecer-se principalmente sobre os sintomas, estruturas e formas de ataque desses patógenos para que eles e seus danos sejam minimizados, sobretudo, controlados (Aparecido e Rosa, 2018).

A primeira coleção de microrganismos com registro é a coleção de Kral localizada na República Tcheca, Praga nos anos de 1980 (Canhos, 2003).

Atualmente são 791 coleções de culturas em 78 países e regiões registrados no World Data Centre for Microorganisms – WDCM em um total de 3.233.108 milhões de microrganismos sendo que 859.234 são fungos. O Brasil tem a participação com 83 coleções de culturas de microrganismos contando com fungos, bactérias, vírus, etc (WDCM, 2020). O que permite estudos nas áreas de farmacologia, alimentícia, agricultura entre outros.

A criação das chamadas micotecas ou coleções de fungos que possuem a finalidade de coletar, preservar disponibilizar os materiais para aqueles que possuem interesse para fins de estudos científicos, aplicações tecnológicas, didáticas entre outros (Abreu e Tutunji, 2004).

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo a obtenção e identificação de fungos causadores de doenças em plantas para montagem de uma micoteca e testar *in vitro* métodos de controle para a Antracnose (*Colletotrichum sp.*), causadora da mancha da Alternaria em diversas culturas.

Metodologia

Os experimentos foram realizados no Instituto Federal de Mato Grosso do Sul (IFMS) Campus Naviraí, no laboratório de Fitossanidade com a identificação de fungos a partir de plantas cultivadas na instituição e também amostras de plantas trazidas de outras regiões, com sintomas e/ou sinais de doença e teste de métodos de controle *in vitro*.

Construção da Micoteca

Para a construção da micoteca foram realizadas as seguintes etapas:

A) Preparo do meio de cultura

Foi utilizado o meio de cultivo Batata, Dextrose e Ágar (BDA). Para a obtenção dos fungos fitopatogênicos, é necessário um meio de cultura nutritivo para que o organismo se alimente e se desenvolva. O mais utilizado nas

práticas fitopatológicas é o BDA com a utilização de pentabióticos para evitar a contaminação de bactérias (Carollo e Filho, 2016).

B) Materiais coletados

Algumas amostras de plantas apresentando sintomas e/ou sinais de doença foram coletados no Campus. Também foram colhidas amostras vegetais de mudas de frutíferas compradas pela instituição, devido a incidência de doenças e também materiais trazidos de outras localidades.

Foram coletadas amostras dos materiais, como folhas, com maiores incidências das doenças e armazenados em pacotes com identificação da cultura e da data de coleta e em seguida levou-as para o laboratório de fitossanidade para realização do isolamento e identificação dos organismos.

C) Isolamentos

Com as amostras vegetais foi realizado o isolamento indireto, onde pedaços do tecido vegetal foram desinfestados superficialmente com álcool 70% por 60 segundos, seguido de hipoclorito 0,1% por 60%, secos em papel filtro esterilizados e transferidos para meio de cultura tipo BDA. As placas foram armazenadas em B.O.D. com temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, para que se desenvolverem em ambiente favorável.

Após alguns dias foi necessária a repicagem dos organismos que se desenvolveram para que não se misturasse entre eles e consequentemente atrapalhassem a identificação. Precisou-se também levar as placas novamente para a B.O.D. para que o fungo purificado se desenvolvesse.

D) Identificação

Preparo de lâminas:

Para o preparo da lâmina utilizou-se de dois métodos, com lamínula ou com fita adesiva do tipo transparente. Na realização do primeiro método, foi necessária lâmina com a borda lateral fosca, azul de metileno para que a estrutura fúngica fosse corada, raspam-se os esporos com a alça de platina, e cobriu-se com lamínula.

No segundo método, foi utilizado o mesmo tipo de lâmina, o azul de metileno e a fita adesiva. Nessa situação, não se usou alça de platina para raspagem, apenas a pinça para segurar a fita e deixou grudar as estruturas dos fungos na mesma.

Em materiais de interesse, utilizou-se esmalte incolor para vedar com o intuito de aumentar o tempo de vida útil daquele organismo na lâmina.

Caracterização morfológica:

Os fungos foram observados em microscópio óptico para caracterização da sua morfologia (Barnett e Hunter, 1998). Com a comparação de seu crescimento *in vitro* e visualização das estruturas do fungo, foi realizada uma fotografia dessas estruturas e as comparou com a literatura para correta classificação.

E) Preservação:

Inicialmente, os fungos purificados foram isolados em tubos de ensaio de vidro, com meio de cultura do tipo BDA. A preservação em óleo mineral é a partir do isolamento em tubos de ensaio, em seguida, o recobrimento da colônia com óleo mineral esterilizado até cerca de 1cm da superfície superior do meio de cultura. O armazenamento precisa ser a uma temperatura de 5°C (Boro et al., 2004; Castellani, 1939).

Além disso, foi utilizado o método de armazenamento em água destilada esterilizada. Nesse caso, foi necessário que os microrganismos tenham de 10 a 15 dias de desenvolvimento em placas de Petri. Em seguida, foi necessário frascos esterilizados de 10mL de capacidade, e adicionar 5mL de água destilada esterilizada nos frascos, e em cada um foi adicionado cinco discos de 0,5 cm de cultura do fungo. Estes foram armazenados em ambiente refrigerado.

F) Controle do patógeno:

Foi utilizado o patógeno *Colletotrichum* sp. identificado na cultura da rúcula.

Foram realizados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1: Fungicida biológico Stimucontrol (composto por *Trichoderma harzianum*);

Tratamento 2: FX Protect (*Bacillus subtilis* e *Bacillus Megaterium*)

Tratamento 3: Extrato de própolis;

Tratamento 4: Extrato de eucalipto;

Tratamento 5: Fungicida químico Orkestra (Piraclostrobina; Estrobilurina e Fluxapiraxade: Carboxamida);

Tratamento 6: Controle.

Meio de cultura foi vertido em placas de Petri na quantidade de 20 mL e após a solidificação discos de 1cm obtidos de placas com crescimento do patógeno foram transferidos para o centro da placa contendo os diferentes tratamentos. Foram testados a concentração de 1%. Como tratamento controle foi utilizado meio BDA puro, ou, seja, sem o produto a ser testado. As placas de Petri foram incubadas em câmara BOD a uma temperatura de 25°C , com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas a cada dois dias, medindo-se o diâmetro em duas medidas diametralmente opostas do crescimento micelial do patógeno perdurando até o décimo dia (Becker, 2015).

Com os dados obtidos foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) obtida por meio da fórmula: $\text{PIC} = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento})/\text{diâmetro da testemunha} \times 100$.

Resultados e Discussão

Com os isolamentos realizados foi identificado e preservado os seguintes fungos: *Pestalotia* sp. e *Fusarium* sp. em mudas de abacate, *Nigrospora* sp. e *Colletotrichum* sp. na cultura

da rúcula, *Fusarium* na goiaba vermelha, *Fusarium* no mamoeiro e *Ferrugem* em mudas de videira (Figura 1).

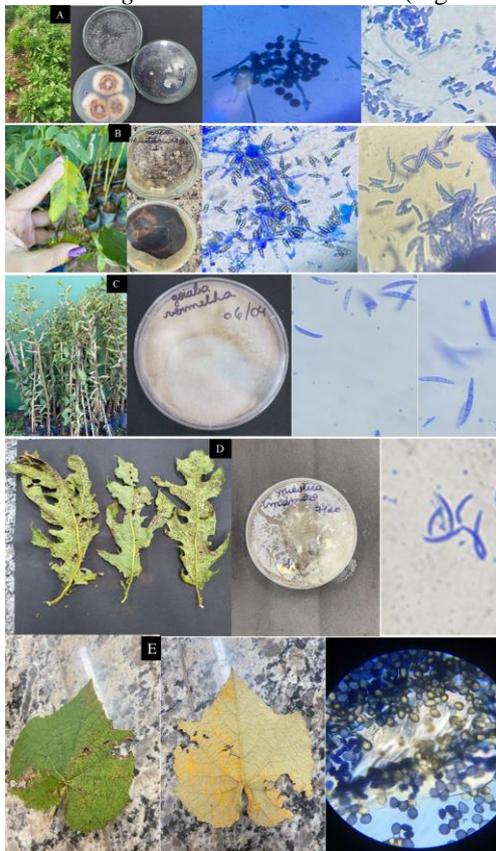


Figura 1. A. *Nigrospora* sp. e *Colletotrichum* sp. em rúcula; B. de *Pestalotia* sp. e *Fusarium* sp. em abacateiro; C. *Fusarium* sp. em goiabeira; D. *Fusarium* sp. em mamoeiro. E. ferrugem da videira, *Pakopsora euvtis*.

Os organismos foram preservados em água, óleo mineral e no método por repicagem contínua que consiste somente de meio BDA (Figura 2).

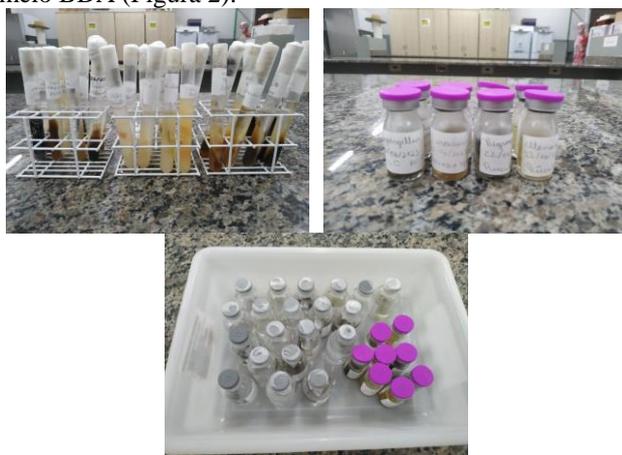


Figura 2. Fungos preservados em meio de cultura tipo BDA, óleo mineral e água destilada esterilizada.

Quando testado os métodos de controle *in vitro* para o patógeno *Colletotrichum* sp., o fungicida químico Orkestra, foi o que apresentou maior inibição do desenvolvimento do fungo, seguido do tratamento natural com extrato de própolis, Fx Protection (*Bacillus subtilis* e *Bacillus Megaterium*) e stimucontrol (*Trichoderma harzium*) (Figura 3).

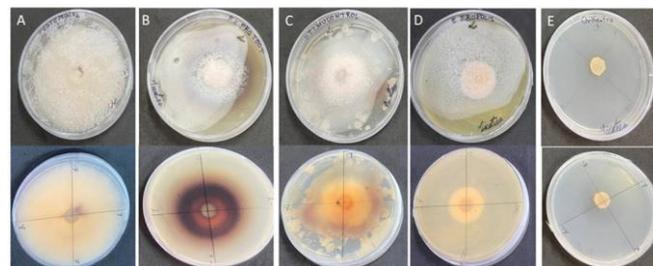


Figura 3. Desenvolvimento do patógeno *Colletotrichum* sp. no décimo dia de avaliação. A. Controle, B. FX Protection, C. Stimucontrol, D. Extrato de Própolis, E. Orkestra.

Foi observado diferença entre os valores médios dos tratamentos. No tratamento com o fungicida orkestra não houve crescimento micelial, seguido de baixo crescimento com extrato de própolis. Extrato de própolis é conhecido por sua atividade antimicrobiana, destacando-se como um produto natural e alternativo no controle de fitopatógenos. O fungicida biológico FX protection, cuja composição é por *Bacillus* também exibiu resposta positiva diferindo estatisticamente do controle. Este produto é indicado no controle de patógenos como *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum gloeosporioides* causadores da doença conhecida como antracnose. O biofungicida Stimucontrol composto por *Trichoderma harzianum* indicado no controle de fungos de solo também teve baixo efeito no controle da alternaria *in vitro* com crescimento de diâmetro de 39 mm e porcentagem de inibição do crescimento micelial de 11%, contudo ainda diferiu da testemunha (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento micelial (mm) e porcentagem de inibição micelial (PIC) da Antracnose sob diferentes tipos de controle.

Tratamentos	Crescimento micelial (mm)					Média
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	10 dias	
Testemunha	12,3 Ca	30,9 Ba	60,1 Aa	66,0 Aa	60,4 Aa	46 a
FX Protection	7,1 Cab	10,5 Cb	35,8 Bc	39,9 Bc	49,4 Ab	29 c
Stimucontrol	13,6 Ca	25,0 Ba	48,3 Ab	56,3 Ab	53,0 Aab	39 b
Extrato Própolis	0,0 Bb	0,0 Bc	2,3 ABd	4,4 ABd	9,4 Ac	3 d
Orkestra	0,0 Ab	0,0 Ac	0,0 Ad	0,0 Ad	0,0 Ad	0 Ad
C.V. (%)						18,55

Tratamentos	PIC (%)					Média
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	10 dias	
Testemunha	0 Ac	0 Ac	0 Ad	0 Ac	0 Ab	0 d
FX Protection	42 Ab	66 Ab	41 Ab	40 Ab	18 Cb	41 c
Stimucontrol	0 Bc	19 Ac	20 Ac	15 Ac	12 Ab	13 b
Extrato Própolis	100 Aa	100 Aa	96 Aa	93 Aa	84 Aa	95 a
Orkestra	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 a
CV (%)						19,7

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Considerações Finais

As práticas realizadas são de suma importância, tendo em vista a necessidade de se conhecer fungos fitopatogênicos, sobretudo para a construção da micoteca, a qual visa estar disponível para futuros estudos da comunidade da instituição.

Além disso, também é de suma importância conhecer as formas de como controlar os fungos causadores de doenças e, principalmente encontrar novas formas eficazes de controlá-los.

Agradecimentos

Ao IFMS pelo fomento e bolsas para realização do projeto.

Referências

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v.02 n.2, p. 236-25, 2004.

APARECIDO, C.C.; ROSA, E.C.; COSTA I.A.M.; JORGE C.M. **Avaliação de diferentes métodos para preservação de fungos fitopatogênicos**, 2018.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**, n. 4, p. 191-192, 1998.

BECKER, Carol Elisa. **Controle da antracnose em pimentão com extrato de própolis**. 2015.

BORO, M.C.; PASSADOR, M.M.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Teste de viabilidade e patogenicidade de culturas preservadas na micoteca do Instituto Biológico de São Paulo pelo método de óleo mineral (implantado em julho de 2003), repicagens periódicas e Castellani (água destilada). In: ENCONTRO DE BIÓLOGOS DO CRBIO-1. 15., 2004, São Pedro, SP, Resumos. São Pedro, 2004. p. 189-190. Resumo 15.35.

CAMARGO, M. FITOPATOLOGIA: HISTORICO. Universidade estadual Paulista. **Faculdade de ciências Agrárias e veterinária campus de Jaboticabal**, 2013.

CANHOS, V.P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. *Ciência e Cultura*, v. 55, p.27-29, 2003.

CAROLLO, E. M.; FILHO, H. P. S. **Manual básico de técnicas fitopatológicas**: laboratório de fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.24, p.270-276, 1939.

FELIX, T. FUNGOS ENDOFÍTICOS EM ESPÉCIES AGRÍCOLAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, 2019.

MORANDI, M. A. B., de PAULA JÚNIOR, T. J., Bettiol, W., & Teixeira, H. **Controle biológico de fungos fitopatogênicos**, 2009.

WDCM, WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS. Culture Collections Information Worldwide. Disponível em: http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col_by_country/b/55/. Acesso em: 08 de jun. de 2020.

2020.