

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE *Fusarium solani*

SILVA, G. V. B.*¹; ARAÚJO, K. L.¹; CHIMELLO, A. M.¹; GILIO, T. A. S.¹;
GIUFRÍDA, L. S.¹

¹ Universidade do Estado de Mato Grosso, departamento de agronomia, Cáceres, MT, Brasil.

RESUMO

Durante o processo de armazenamento de microrganismos, a sobrevivência dos mesmos, não constitui o único objetivo do procedimento, mas também, a preservação de suas características originais. À vista disso, o objetivo do estudo foi avaliar o crescimento micelial de sete isolados do complexo de espécies *Fusarium solani* armazenados em diferentes períodos. Para tanto, foi utilizando o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com sete isolados preservados em quatro períodos de armazenamento, com cinco repetições por tratamento. Os períodos referem-se a 7, 5, 4 e 1 ano que os isolados foram preservados em segmentos de papel filtro e armazenados na micoteca do laboratório a uma temperatura de 4° C., posteriormente, foram preparadas placas de Pétre vertidas com meio de cultura B.D.A., onde foi depositado um fragmento de papel filtro do respectivo inóculo no centro da placa, posteriormente, alocadas em câmara incubadora a 25° C. O crescimento das colônias foi aferido diariamente, sendo cessado a partir do momento em que a primeira colônia atingisse toda circunferência da placa. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e testados a significância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$). A partir disso, foi observado, que o crescimento dos isolados de *F. solani* sofreu poucas interferências em função do fator tempo de armazenamento, portanto, o método de papel filtro pode ser considerado como eficiente na preservação da característica de crescimento da maior parte dos isolados. Os isolados de *F. solani* apresentam diferentes taxas de crescimento micelial.

Palavras-chave: preservação; recursos genéticos; fitopatógeno; métodos de preservação; microorganismos.

INTRODUÇÃO

A adoção de um determinado método de armazenamento no momento de estocagem de uma amostra biológica, quase sempre é cercada de incertezas, haja vista que as características originais do material podem ser influenciadas por diversos fatores. Dentre eles, as características do material a ser preservado e o método empregado, são alguns dos fatores mais relevantes. A aplicação do método mais eficiente pode promover a superação de barreiras cronológicas e geográficas, bem como assegurar, o desenvolvimento de pesquisas e, conseqüentemente, a compreensão das particularidades desses organismos (Sola et al., 2012).

Tratando-se de fungos necrotróficos, há uma diversidade de métodos de preservação desses agentes, como: nitrogênio líquido, liofilização e água destilada (Aparecido et al., 2012).

No entanto, a escolha do método a ser utilizado deve considerar as particularidades do agente nas características do próprio método de conservação, bem como, na capacidade laboratorial e a disponibilidade de equipamentos (Sola et al., 2012). Nesse contexto, Costa et al. (2009) pondera que não há um método universal de preservação de amostras biológicas, independentemente da sua natureza.

Portanto, para uma precisa análise acerca das características fenotípica e genotípica de microrganismos, é requerido estudos quanto a manutenção a longo prazo destes em micoteca (Girão et al., 2004). Desse modo, tais estudos, permitirão o desenvolvimento de tecnologias que superem barreiras cronológicas, acerca da preservação dos diferentes organismos (Sola et al., 2012).

Fungos do gênero *Fusarium* apresentam ampla diversidade fenotípica e genotípica (Jacobson, Gordon, 1991), sendo que as características morfológicas são fundamentais para a identificação das espécies desse gênero, todavia, as espécies desse gênero apresentam significativas diferenças morfológicas e fisiológicas (Chaves, 2015). Alterações nas características morfofisiológicas originais dos indivíduos provocadas pelo processo de armazenamento pode comprometer todo o processo de identificação do espécime. Diante disso, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação refere-se sobre a estabilidade dos espécimes quando submetidos ao armazenamento (Holland et al., 2003).

Nesse contexto, embora haja o reconhecimento da importância desses organismos para os diversos segmentos, segundo Sola et al. (2012), é possível observar uma lacuna quanto as publicações científicas pertinentes a preservação *ex situ* de microrganismos. Observa-se ainda, uma maior escassez de estudos que relacionem as condições iniciais do agente, com as condições após o processo de armazenamento seja em nível de espécies ou em nível de isolados de uma mesma espécie. Em vista disso, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o crescimento de isolados de *F. solani* preservados diferentes períodos pelo método de papel filtro.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), pertencente a Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Foram selecionados os sete isolados de *F. solani* mais agressivos (Marostega et al., 2019) (tabela 1), pertencentes a micoteca do LMGV, preservados em segmentos de papel filtro e armazenados há 7, 5, 4 e 1 anos.

Tabela 1. Relação dos isolados de *F. solani*, para a avaliação do crescimento micelial.

Número na coleção	Origem	Bioma
FS25	Alta Floresta – MT	Amazônia
FS31	Nossa Sr. ^a do livramento - MT	Pantanal
FS33	Santo Antônio do Leveger - MT	Pantanal
FS38	Santo Antônio do Leveger - MT	Pantanal
FS40	Campo Verde - MT	Cerrado
FS46	Santo Antônio do Leveger - MT	Pantanal
FS50	Campo Verde - MT	Cerrado

As colônias foram produzidas a partir de segmentos de papel filtro contendo o inóculo dos isolados, onde estes foram depositados em placas de Petri (seis cm de diâmetro) estéreis contendo meio de cultura B.D.A. (batata-dextrose-ágar) e mantidos a 25° C., com fotoperíodo de 12 horas, em câmara incubadora. As plaquinhas foram alocadas seguindo o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com sete isolados e quatro períodos de preservação, totalizando 28 tratamentos com cinco repetições.

Os isolados foram avaliados quanto a taxa de crescimento. Para tanto, o crescimento das colônias foi aferido diariamente com o auxílio de paquímetro digital (mm), onde foram mensuradas a área de ocupação do micélio fúngico, em dois sentidos diametralmente opostos. As avaliações foram cessadas a partir do momento em que a primeira colônia atingisse toda a circunferência da placa, nesse caso ao quarto dia após a repicagem. A partir disso, foi calculado a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM).

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e testados a significância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a ($\alpha \leq 0,05$), ambos através do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado FS25, preservado há 7 anos, não foi viável e o segmento preservado apresentou contaminação, portanto, não foi avaliado o respectivo inóculo preservado.

Ao analisar os dados contidos na análise de variância (tabela 2), foi observado diferenças significativas ($p. \leq 0,01$) dos isolados, tempo de preservação e da interação isolados x tempo para a característica de Área Abaixo da Curva do Crescimento Micelial (AACCM).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de sete isolados de *F. solani* preservados em diferentes períodos, Cáceres-MT, 2022.

F. V.	G. L.	Q. M. AACCM
Isolados	6	3129317,53**
Tempo	3	1693737,29**
Isolados x Tempo	17	2957929,88**
Resíduo	108	19562,15
Média Geral		2241,53
C. V. %		28,90

(**) significativo a 1%, (*) significativo a 5% e (ns) não significativo, pelo teste F.

Conforme a tabela 3, o isolado FS46 foi o isolado que apresentou maior AACCM no período de 7 e 5 anos. Contudo, quando preservados há 4 anos esse comportamento também é observado para os demais isolados, exceto para o isolado FS38 que se diferenciou do FS50. Por fim, entre os isolados preservados há 1 ano, o isolado FS50 apresentou maior AACCM, quando comparado com os isolados FS46, FS40 e FS33. Diante disso, percebe-se variações na taxa de crescimento dos isolados, o que indica a interferência no fator tempo de manutenção dessa característica.

Tabela 3. Interação do fator tempo de preservação e isolados de *F. solani* para crescimento micelial, Cáceres-MT, 2021.

Isolados	AACCM			
	7 anos	5 anos	4 anos	1 ano
FS25	-----	2305,80bcA	1773,99abA	1746,76abcA
FS31	1842,77bcA	1975,60bcA	2106,88abA	2747,02abA
FS33	1533,60cB	2756,46bA	2589,54abAB	1631,84bcB
FS38	2722,93bA	1436,64cB	1620,79bB	1841,63abcAB
FS40	1886,20bcA	2050,93bcA	2226,95abA	1551,62bcA
FS46	4413,10aA	4245,76aA	1770,25abB	1460,35cB
FS50	2046,79bcA	2409,93bcA	2925,74aA	2901,31aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$). AACCM: Área Abaixo da Curva do Crescimento Micelial.

Santos (2015), ao realizar a caracterização cultural de 10 isolados de *F. oxysporum*, observou diferenças significativas nas médias de crescimento das colônias, o que indica que variações no crescimento de isolados também ocorrem em outras espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*. Estudos que avaliam o crescimento de espécies do gênero *Fusarium*, ainda são escassos nos acervos de pesquisa, sendo também, carente de estudos que abordem o crescimento nível de isolados de uma espécie.

Quanto a interação do fator isolados e tempo, apenas ao isolados FS33, FS38 e FS46 sofreram interferência. O isolado FS46 teve a taxa de crescimento reduzida quando preservado por menos de 5 anos, ou seja, quando preservado há 7 e 5 anos, este isolado manteve seu ritmo de crescimento estatisticamente superior quando comparado ao tempo de 4 e 1 ano de armazenamento. Por outro lado, esse comportamento, não foi observado nos isolados FS38 e FS33. A taxa de crescimento desses últimos, variou ao logo dos anos, mas de forma com que não é percebido um parâmetro de crescimento devido as oscilações no crescimento.

Para o isolado FS38, os períodos de 5 e 4 anos, foram os períodos em que este isolado apresentou menor AACCM, enquanto que, quando preservado há 1 e 7 anos a AACCM foi estatisticamente superior. Por fim, o isolado FS38 tem como menor taxa de crescimento micelial os períodos de 1 e 7 anos, se opondo aos períodos de 5 e 4 anos, quando apresentou estatisticamente uma maior AACCM.

Os isolados FS25, FS31, FS40 e FS50, foram os isolados que melhor mantiveram sua taxa de crescimento micelial preservados ao longo do tempo, não expressando variações em função do tempo para AACCM. Este comportamento pode estar ligado tanto as características biológicas desses isolados, quanto a eficiência do método de armazenamento empregado.

Segundo Beloti (2015), o melhor método de preservação de espécies do gênero *Fusarium* spp, é o de liofilização. O autor descreve ainda, que o Fusarium Research Center, na Universidade do Estado da Pensilvânia, preserva quase 16 mil culturas através desse método, onde todas permanecem viáveis. No entanto, na escolha do método a ser empregado, devem ser consideradas as vantagens e desvantagens dos métodos disponíveis (Sola et al., 2012), onde, verifica-se que para o processo de liofilização, a necessidade de equipamentos

onerosos para a desidratação do material, além dos custos com o preparo das culturas (Zamora et al., 2006).

Em literatura, trabalhos que avaliam a viabilidade de fitopatógenos em função dos diferentes métodos de armazenamento são relativamente comuns, onde se observa a preservação por grandes períodos: Passador et al. (2010) *F. oxysporum* agente patogênico ao cogumelo “champignon” 34 anos pelo método Castalleni; Beloti (2015) isolado de *F. solani* por até 11 anos pelo método de Terriço. Contudo, cabe ressaltar, que são escassos os trabalhos que analisam as alterações provocadas pelo método de armazenamento aplicado ao longo do tempo de armazenamento, bem como as implicações que estas podem promover.

CONCLUSÃO

O crescimento dos isolados de *F. solani* sofreu poucas interferências em função do fator tempo de armazenamento, portanto, o método de papel filtro pode ser considerado como eficiente na preservação da característica de crescimento da maior parte dos isolados. Os isolados de *F. solani* apresentam diferentes taxas de crescimento micelial.

REFERÊNCIAS

APARECIDO, C. C.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; CAMILO, C. M. Preservação de microorganismos a -80° C. **Divulgação Técnica**. Biológico, São Paulo, v.74, n.1, p.23-29, 2012. Disponível em: http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v74_1/aparecido2.pdf. Acesso em: 15 jun. 2021.

BELOTI, I. F. Viabilidade de fungos necrotróficos sob diferentes métodos de preservação. 2015, 89 f. **Dissertação** apresentada a Universidade Federal de Uberlândia para titulação de mestre. Área de concentração em fitopatologia. 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12227>. Acesso em: 04 de out. de 2021.

CHAVES, A. L. S. Análise Microbiológica de Isolados de *Fusarium* spp. em um Hospital de Oncologia do Rio de Janeiro, Brasil. **Dissertação** apresentada ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em ciências - Área de Concentração: Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Orientador: Dr. Bodo Wanke. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/25117/2/alessandra_chaves_ini_mest_2015.pdf. Acesso em: 27 abr. 2021.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAÚJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p. 111 - 122, 2009. Disponível em: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009.pdf. Acesso em: 15 jun. 2021.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência agrotecnológica**, Lavras, MG, v. 36, n. 6, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>. Acesso em: 16 de out. de 2021.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, A. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 37, n. 3, p. 229 – 233, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000300007>. Acesso em: 15 jun. 2021.

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**, California, p. 217-234, 2003. Disponível em: 10.1016/s1383-5742(02)00090-x

JACOBSON, D. J.; GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis: A Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium* case study of diversity within a formae specialis. **Phytopathology**, v. 81, n. 9, p. 1064 - 1067, 1991.

MAROSTEGA, T. N.; LARA, L. P.; OLIVEIRA, D. S.; CHIMELLO, A. M.; GILIO, T. A. S.; PREISIGKE, S. C.; SERAFIM, M. E.; NEVES, L. G. Molecular and Aggressiveness Characterization of Isolates of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. passiflorae Associated to Passion Fruit Wilting. **Journal of Agricultural Science**, 378 Canadá v. 11, n. 3, p. 407 – 420, 2019. Disponível em: 10.5539 / jas.v11n3p407. Acesso 379 em: 22 de out. de 2021.

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.51 - 55, 2010. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v72_1/passador.pdf. Acesso em: 03 de nov. de 2021.

SANTOS, A. B. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* associados a podridão do colo maracujazeiro no estado do Ceará. 2015, 30 f. Monografia (Graduação em 421 Engenharia Agrônoma), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, 30 f. 2015. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/36605>. Acesso em 06 de nov. de 2021.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; RESENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.8, n.14; p. 1398 – 1418, 2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2021.

ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Taxas de sobrevivência comparativas de bactérias de ácido láctico isoladas de sangue, após secagem por pulverização e secagem por congelamento. **Food Science and Technology International**. 2006; 12 (1): 77-84. Disponível em: doi: 10.1177 / 1082013206062443. Acesso em: 17 de nov. de 2021.