

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS E AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

IGOR FORIGO BELOTI

VIABILIDADE DE FUNGOS NECROTRÓFICOS SOB DIFERENTES MÉTODOS
DE PRESERVAÇÃO

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

IGOR FORIGO BELOTI

VIABILIDADE DE FUNGOS NECROTRÓFICOS SOB DIFERENTES MÉTODOS
DE PRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B452v Beloti, Igor Forigo, 1989-
2015 Viabilidade de fungos necrotróficos sob diferentes métodos de
preservação / Igor Forigo Beloti. - 2015.
89 p. : il.

Orientador: Fernando Cezar Juliatti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Fungos fitopatogênicos - Teses. 3.
Microorganismos fitopatogênicos - Teses. I. Juliatti, Fernando Cezar,
1957-. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

IGOR FORIGO BELOTI

VIABILIDADE DE FUNGOS NECROTRÓFICOS SOB DIFERENTES MÉTODOS
DE PRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração
em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2015.

Dra. Adriana de Andrade Figueiró

UFU

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

UEPG

Profa. Dra. Juliana Araújo Santos Martins

IFTM

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

“Labor omnia vincit”

Publius Vergilius Maro (ROSS, 1987)

AGRADECIMENTOS

Agradeço o Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti pela orientação, ao técnico Roberto Resende dos Santos e ao estagiário Natan Rodrigues Martins pelo auxílio prestado, ao Prof. Dr. Bruno Teixeira Ribeiro e a técnica Luciana Alves de Sousa pelo apoio material recebido.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	a
LISTA DE FIGURAS	b
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Importância das coleções de interesse fitopatológico (<i>ex situ</i>).....	3
2.2 Principais coleções e órgãos regulamentadores.....	4
2.3 Métodos de preservação para fungos.....	6
2.4 Escolha do método	9
2.5 Métodos de preservação de fungos necrotróficos em curto prazo.....	10
2.5.1 Repicagens periódicas	10
2.5.2 Tecidos secos do hospedeiro	12
2.6 Métodos de preservação de fungos necrotróficos em médio prazo.....	13
2.6.1 Água estéril (Castellani)	13
2.6.2 Óleo mineral	14
2.6.3 Terriço	16
2.6.4 Estruturas de resistência em grãos.....	17
2.6.5 Papel-filtro	17
2.6.6 Sílica-gel.....	18
2.6.7 Congelamento.....	19
2.7 Métodos de preservação de fungos necrotróficos em longo prazo.....	19
2.7.1 Liofilização.....	19
2.7.2 Criopreservação	22
2.7.2.1 Nitrogênio líquido	24
2.7.2.2 Ultracongelamento.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26

3.1 Isolados preservados em terrço	26
3.2 Isolados preservados em óleo mineral.....	30
3.3 Isolados preservados em gelatina	32
3.4 Isolados (estruturas de resistência) preservados em 4 °C.....	35
3.5 Isolados preservados em sílica-gel	35
3.6 Avaliação da viabilidade	37
3.7 Avaliação da esporulação	39
3.8 Avaliação da colonização/patogenicidade.....	39
4 RESULTADOS	41
4.1 Avaliação da viabilidade, esporulação e colonização/patogenicidade	41
4.1.1 Método terrço	41
4.1.2 Método óleo mineral.....	47
4.1.3 Método gelatina	49
4.1.4 Estruturas de resistência em 4 °C	51
4.1.5 Método sílica-gel	52
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	78

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
TABELA 1 Relação dos fungos preservados no LAMIP pelo método terriço. Uberlândia (MG), 2015. Fonte: BELOTI (2015)	27
TABELA 2 Relação dos fungos preservados no LAMIP pelo método óleo mineral (vaselina). Uberlândia, MG. Fonte: BELOTI (2015)	31
TABELA 3. Relação dos fungos preservados no LAMIP pelo método Gelatina. Uberlândia, MG. Fonte: BELOTI (2015)	34
TABELA 4. Relação dos escleródios (<i>S. sclerotiorum</i>) preservados em 4 °C no LAMIP. Uberlândia, MG. Fonte: BELOTI (2015)	35
TABELA 5. Relação dos fungos preservados no LAMIF pelo método sílica-gel. Monte Carmelo, MG. Fonte: BELOTI (2015)	37
Tabela 6. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA e AA preservados pelo método terriço. Uberlândia (MG). Fonte: BELOTI (2015)	42
Tabela 7. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA pelo método óleo mineral. Uberlândia (MG). Fonte: BELOTI (2015)	48
Tabela 8. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA pelo método gelatina. Uberlândia (MG). Fonte: BELOTI (2015)	50
TABELA 9. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA pelo método sílica-gel. Monte Carmelo (MG). Fonte: BELOTI (2015)	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
FIGURA 1. Métodos de preservação utilizados para fungos.	8
FIGURA 2. Esquema para escolha dos métodos de preservação.	10
FIGURA 3. Procedimentos para realização do método gelatina.	33
FIGURA 4. Frascos âmbar contendo sílica e discos de papel, prontos para receber as tiras de papel com inóculo.	36
FIGURA 5. Inoculação com palito.	39
FIGURA 6. Sintomas e sinais dos fungos inoculados para o método terriço..	46
FIGURA 7. Sintomas e sinais dos fungos inoculados para o método óleo mineral.	49
FIGURA 9. Sintomas e sinais da inoculação de <i>S. sclerotiorum</i> preservado em 4 °C....	52
FIGURA 10. Sintomas e sinais dos fungos inoculados para o método sílica-gel..	54

RESUMO

BELOTI, IGOR FORIGO. **Viabilidade de fungos necrotróficos sob diferentes métodos de preservação.** 2015. 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

As coleções *ex situ* de culturas fúngicas são um importante patrimônio biológico, úteis à micologia e fitopatologia como suporte em trabalhos científicos. Disponibilizam patógenos a qualquer momento para: identificação, estudos morfofisiológicos, ciclo de vida, epidemiologia, resistência aos fungicidas e programas de melhoramento, visando resistência a doenças. Não há um método de preservação que seja eficiente e recomendado para os diferentes grupos de fungos, sendo mais adequado aquele que manter, mesmo após longos períodos, as características originais da cultura – viabilidade, esporulação e patogenicidade –, evitando mutações e contaminações indesejadas. A escolha irá depender da infraestrutura do laboratório, do microrganismo em estudo, dos objetivos do trabalho e de preferências e conhecimentos do pesquisador. Para os fungos necrotróficos, que passam alguma fase de seu ciclo de vida como saprófitas, podendo ser isolados em meio de cultivo, utilizam-se: repicagens periódicas, tecidos secos do hospedeiro, Castellani, óleo mineral, terriço, congelamento, sílica-gel, liofilização e criopreservação. O trabalho objetivou avaliar a eficiência de métodos de preservação e o tempo máximo de manutenção da viabilidade, esporulação, colonização/patogenicidade de fungos fitopatogênicos necrotróficos utilizados no Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP) em Uberlândia (MG) e no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) em Monte Carmelo (MG), preservados pelos métodos: terriço (68 isolados), escleródios (*Sclerotinia sclerotiorum*) em 4 °C (10 isolados), gelatina (17 isolados), óleo mineral (31 isolados) e sílica-gel (14 isolados), em diferentes datas. Mantiveram-se viáveis 38 isolados em terriço, três isolados em óleo mineral e 10 isolados em gelatina. O tempo máximo de preservação de escleródios foi de quatro anos, sendo que todos os isolados em sílica-gel permaneceram viáveis.

Palavras-chave: Colonização, esporulação, patogenicidade, preservação *ex situ*, viabilidade.

¹ Orientador: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti - UFU

ABSTRACT

BELOTI, IGOR FORIGO. **Viability of necrotrophic Fungi under different preservation methods**. 2015. 89 p. Uberlândia: UFU, 2015. 89 p. Dissertation (Master Program Agronomy/ Phytopathology) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia. ¹

The *ex situ* fungal cultures collections represent important biological heritage and is useful for mycologists and plant pathologists, supporting several scientific works. They provide viable pathogens anytime and assisting at identification, morpho-physiological aspects, life cycle, epidemiology, resistance to fungicides and breeding programs in resistance of diseases. However, there is not a universal preservation method that is efficient and suitable for the different groups of fungi. The most appropriate is the one that maintain, even after long periods, the original characteristics of culture: viability, sporulation and pathogenicity, excluding mutations and undesirable contamination. The choice will depend of the laboratory infrastructure, micro-organism, objectives, preferences and knowledge of the researcher. For necrotrophic fungi, after passing their life cycle stage as saprophytes they can be isolated in growing medium, using different preservation methods, especially: periodic transfer, dried host tissues, sterile water (Castellani), mineral oil, sterile soil, freezing, silica gel, lyophilization and cryopreservation. The study aimed to describe the efficiency of sterile soil (68 isolates), resistant structures (*Sclerotinia sclerotiorum*) in 4°C (10 strains), gelatin (17 strains), mineral oil (31 strains) and silica gel (14 strains) on the maintenance of viability, sporulation and colonization-pathogenicity of phytopathogenic necrotrophic fungi preserved in different dates, in Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP), Uberlândia (MG), and in Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF), Monte Carmelo (MG). The gelatine method has never been tested for fungi. The viability remained in 38 strains of sterile soil; three of mineral oil, 10 of gelatin. Sclerotia's maximum time of preservation was four years, and all fungal strains were viable on silica gel.

Keywords: Colonization, pathogenicity, preservation *ex situ*, sporulation, viability.

¹ Major Professor: Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti - UFU

1 INTRODUÇÃO

A prática de se preservar microrganismos inicia-se com o desenvolvimento da microbiologia como ciência autônoma. A partir do século XIX, apresentou notável desenvolvimento a partir do reconhecimento da grande importância dos fungos, algas, bactérias e demais microrganismos. Por esse motivo, com o objetivo de isolar, cultivar e preservar tais espécies, inúmeras técnicas passaram a ser desenvolvidas e aprimoradas. Nesse contexto, culturas fúngicas fitopatogênicas preservadas em laboratório são primordiais para trabalhos e pesquisas de micólogos e fitopatologistas (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1975; FIGUEIREDO et al., 1980).

O isolamento, a identificação, a preservação e o uso de microrganismos são práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de pesquisas, processos e a obtenção de produtos de interesse econômico. Assim, é necessário manter os isolados viáveis por longos períodos (GIRÃO et al., 2004), evitando a ocorrência de mutações que alterem as suas características (APARECIDO; FIGUEIREDO, 1997). Em alguns casos, deseja-se preservar um microrganismo que foi selecionado e melhorado, com vistas a manter sua nova identidade (DELLARETTI, 2014). Vale ressaltar que a preservação de uma linhagem não visa somente manter inalterado o estado inicial do microrganismo, mas conhecer o período máximo de viabilidade celular e o número de células viáveis (APARECIDO et al., 2013).

A preservação de patógenos é necessária para a comparação entre diferentes espécies, a identificação de novas raças e os estudos laboratoriais (FURTADO et al., 2008). Rotineiramente, é mais empregada para a realização de bioensaios (FONG et al., 2000; GIRÃO et al., 2004).

Um método que seja confiável e eficaz permite propágulos suficientes para inoculação em testes de patogenicidade, pesquisas visando resistência de plantas a doenças, resistência adquirida a fungicidas e elaboração de estudos retrospectivos e prospectivos. Com isso, elucidam-se o estado biológico, a etiologia e os aspectos epidemiológicos (FONG et al., 2000; GIRÃO et al., 2004).

O desenvolvimento de metodologias mais adequadas à preservação de microrganismos é de grande importância. Todavia, observa-se uma grande lacuna entre

as publicações científicas pertinentes, com um número reduzido de estudos abordando a problemática da seleção e validação de protocolos, bem como a avaliação dos desafios e perspectivas de coleta, processamento, estocagem e manutenção de amostras microbiológicas (SOLA et al., 2012). Diante do exposto, nota-se a relevância dos métodos de preservação de culturas fúngicas em laboratório; logo, o conhecimento acerca do método mais apropriado se faz necessário.

Destarte, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de métodos de preservação utilizados no Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP) em Uberlândia (MG) e no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) em Monte Carmelo (MG), e o tempo máximo de manutenção da viabilidade, esporulação, colonização/patogenicidade de fungos fitopatogênicos necrotróficos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância das coleções de interesse fitopatológico (*ex situ*)

Dentre as formas de se manter o patrimônio genético, é possível descrever duas categorias: a preservação *in situ* (no local de origem) e a preservação *ex situ* (fora do local de origem). A preservação *ex situ*, a partir de coleções de culturas, tem garantido a sobrevivência, a estabilidade e a pureza de linhagens durante longos períodos, empregando diversos métodos de manutenção e, principalmente, disponibilizando as culturas para a comunidade científica e tecnológica de diversos países (ANJOS et al., 2012; SOLA et al., 2012).

Microrganismos e materiais biológicos têm sido historicamente preservados e distribuídos por coleções de culturas. Os diferentes tipos de coleções têm importância destacada na preservação e exploração da diversidade genética e metabólica, com a finalidade de pesquisa e desenvolvimento (CANHOS, 2003). A preservação *ex-situ* de recursos genéticos microbianos, vegetais e animais é uma prática indispensável ao desenvolvimento da ciência e tecnologia em diversos setores de relevância socioeconômica. Ela permite dispor do microrganismo a qualquer momento para a realização de experimentos, trabalhos de rotina, atendimento a solicitações de outros pesquisadores, fins didáticos, estudos comparativos, dentre outros (GERHARDT, 1994).

De fato, tais coleções são essenciais para o suporte ao desenvolvimento da biotecnologia, provendo insumos, material biológico certificado e informações associadas, além de funcionar como centros de conservação da biodiversidade e de material genético (ABREU; TUTUNJI, 2004). São, portanto, ferramentas fundamentais para profissionais, uma vez que estreitam o conhecimento e fortalecem a interação dos grupos, suplantando fronteiras para a multidisciplinaridade de modo atemporal e sem delimitação geográfica (SOLA et al., 2012).

As estratégias tradicionais de isolamento e seleção de microrganismos têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente. Nos últimos anos, novas abordagens de trabalho, envolvendo metodologias de bioinformática e biologia molecular, permitem a

prospecção de informações a partir de dados genômicos e a análise de microrganismos sem a necessidade de isolamento e cultivo, a partir da clonagem direta de DNA de amostras ambientais (OLIVEIRA et al., 2006). Nesse sentido, pesquisas referentes à análise de DNA e ao mapeamento genético enfatizam ainda mais a importância de coleções vivas para estudos filogenéticos (LEAL-BERTOLI, 1998).

Diversos países têm sugerido a ampliação de coleções, com a formalização de redes distribuídas pelo mundo, incluindo normas padronizadas, harmonização de ações, gerenciamento de informações e transparência da comunicação. Isso seria feito para que as coleções de culturas passem a ser de propriedade mundial, com aplicação destinada à comunidade, para seu bem-estar e segurança (SOLA et al., 2012).

A devida caracterização e preservação dos recursos microbianos são fundamentais para o desenvolvimento da bioeconomia no século XXI (OLIVEIRA et al., 2006). Países em desenvolvimento ainda não perceberam a importância de desenvolver conhecimentos para bioprospecção, preservação e uso da diversidade microbiana (CANHOS, 1994). A existência de uma coleção de fungos também sana dificuldades, como a aquisição de material de coleções do exterior e o perigo, sempre presente, da introdução de raças e biótipos de patógenos inconvenientes à nossa agricultura (APARECIDO; CAMILO, 2013).

2.2 Principais coleções e órgãos regulamentadores

Existem várias coleções, com ênfase em microrganismos de relevância mundial como a American Type Culture Collection (ATCC), de Maryland, nos EUA; a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), na Alemanha; o International Mycological Institute (IMI), com sede na Inglaterra; o Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), em Baar-Delft, Holanda; o Institute For Fermentation (IFO), em Osaka, Japão; o Japan Collection of Micro-organisms (JCM), em Wako, Japão; e a Mycothèque De L'Université Catholique de Luvain (MUCL), localizada em Luvain-le-Neuve, Bélgica (CAVALCANTI, 2010).

Exemplos de coleções em que predominam a preservação de isolados fúngicos são o Fusarium Research Center, na Universidade do Estado de Pensilvânia (EUA), com aproximadamente 16 mil isolados (SINGLETON et al., 1992); e o Cereal Research

Centre (CRC) em Winnipeg, Manitoba (Canadá), para manutenção de isolados de *Ustilago tritici* (MENZIES et al., 1997).

A World Federation for Culture Collections (WFCC) e a European Culture Collection Organization (ECCO) atuam como fóruns de discussão, agrupando uma massa crítica de coleções e usuários a fim de facilitar o progresso da preservação genética *ex situ*. O WFCC reúne em torno de 700 sócios, pertencentes a 62 países, e conta com aproximadamente 470 coleções registradas no World Data Center for Micro-organisms (WDCM). Das coleções cadastradas no WDCM, estima-se a manutenção de mais de um milhão de cepas, em que 44% são fungos, 43% bactérias, 2% vírus, 1% células vivas e 10% espécimes como plasmídeos, plantas, células animais e algas (ABREU; TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

Diante da imensa diversidade genética entre os microrganismos e da necessidade de preservação desses recursos, é primordial a intercomunicação entre os núcleos de coleções de culturas a fim de fortalecer o desenvolvimento de pesquisas no país (SOLA et al., 2012).

O histórico das coleções brasileiras voltadas à fitopatologia remonta a expansão da agricultura e o cultivo de grandes áreas, o que proporcionou elevação da importância dos problemas causados por inúmeros fitopatógenos, acarretando prejuízos, via diminuição da produção, bem como elevação dos gastos com produtos fitossanitários para o manejo das doenças. Assim, as coleções de culturas foram impulsionadas possibilitando a realização de pesquisas tanto básicas como aplicadas a qualquer tempo, de forma que dados relevantes sobre fitopatógenos de interesse pudessem ser obtidos e aplicados na melhoria dos métodos de manejo a partir da seleção genética de plantas resistentes (FINATTI; APARECIDO, 2009).

Apesar da existência de pequenas coleções no Brasil, até a década de 1960, os técnicos que desenvolviam trabalhos com organismos fitopatogênicos costumavam enviar culturas consideradas de interesse para serem mantidas em coleções no exterior, sem se preocupar em mantê-las na própria instituição ou em coleções no país. Assim, quando havia a necessidade de culturas puras de um determinado patógeno, era necessário recorrer a coleções do exterior ou realizar o isolamento a partir de materiais doentes coletados ou recebidos para análise. A existência de coleções nacionais diminuiu essas dificuldades, permitindo a cooperação entre inúmeros fitopatologistas no

atendimento a solicitações para trabalhos de pesquisa e ensino (FINATTI; APARECIDO, 2009).

Há diversas coleções de culturas existentes no Brasil, a exemplo da micoteca Mário Barreto de Figueiredo, localizada no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico em São Paulo (SP). Ela teve início em 1961 a partir de uma coleção particular e conta, atualmente, com cerca de 750 culturas. Desde março de 2011, a referida micoteca está credenciada junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), do Ministério do Meio Ambiente, como coleção “fiel depositária” (APARECIDO; CAMILO, 2003).

Outro exemplo é o Instituto Biológico de Campinas (FINATTI; APARECIDO, 2009), além de pequenas coleções localizadas em instituições de pesquisa e ensino superior, como é o caso do Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP), do Instituto de Ciências Ambientais e Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (ICIAG/UFU).

2.3 Métodos de preservação para fungos

Os fungos fitopatogênicos se dividem em duas classes distintas, de acordo com o seu parasitismo: parasitas obrigatórios ou biotróficos, que durante todo o ciclo estão em associação com o seu hospedeiro; e parasitas não obrigatórios ou necrotróficos, que requerem a planta hospedeira por parte de seus ciclos de vida, mas podem finalizar seus ciclos tanto em restos culturais como associados à planta viva (AGRIOS, 2004).

Para fungos necrotróficos, diversos métodos de preservação em laboratório podem ser utilizados, tais como: baixas temperaturas, nitrogênio líquido, sílica-gel, óleo mineral, terriço, tecidos secos do hospedeiro, repicagens periódicas, Castellani e liofilização (PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989).

Enquanto isso, para fungos biotróficos (agentes causais de ferrugens, míldios, oídios, carvões e cáries), os métodos comumente utilizados envolvem liofilização, manutenção em baixas temperaturas (ultrafreezer ou nitrogênio líquido) (GARCIA et al., 2007), sílica-gel (PÉREZ-GARCÍA et al., 2006) com boa manutenção de sua viabilidade e patogenicidade. A variedade de métodos recomendados na literatura reflete a falta de um procedimento que seja abrangente e satisfatório para diferentes grupos de fungos (APARECIDO; CAMILO, 2003).

Tais métodos podem ser divididos de acordo com o tempo máximo no qual os isolados podem permanecer sem ser manipulados: (a) métodos de curto prazo: repicagens periódicas; (b) métodos de médio prazo: óleo mineral, Castellani, -20 °C, dessecação em sílica-gel, solo e papel-filtro; (c) métodos de longo prazo: liofilização, criopreservação em -80 °C e nitrogênio líquido (-196 °C) (APARECIDO et al., 2013). Diversos protocolos têm sido desenvolvidos e aplicados, porém, a maioria não tem se mostrado plenamente eficaz, em virtude das peculiaridades de cada agente e até mesmo das características das técnicas; por isso, vem se justificando a conjunção de dois ou mais métodos, a fim de se garantir a melhor recuperação dos microrganismos (GREEN, 2008; COSTA et al., 2009), além de procedimentos que porventura possam ser criados em laboratório.

Na Figura 1 observa-se a divisão dos métodos para fungos biotróficos e não biotróficos de acordo com Aparecido et al. (2013). Esse esquema abrange o procedimento mais utilizado nos laboratórios de fitopatologia, embora haja combinações. Cumpre destacar que existem trabalhos envolvendo a preservação de fungos necrotróficos em nitrogênio líquido (SINGLETON, 1992; CARLING; SUMNER, 1992) e ultracongelamento (APARECIDO et al., 2013), assim como estudos para preservação de fungos biotróficos em tecidos secos do hospedeiro (IMBABY et al., 2005) e sílica-gel (PÉREZ-GARCÍA et al., 2006).

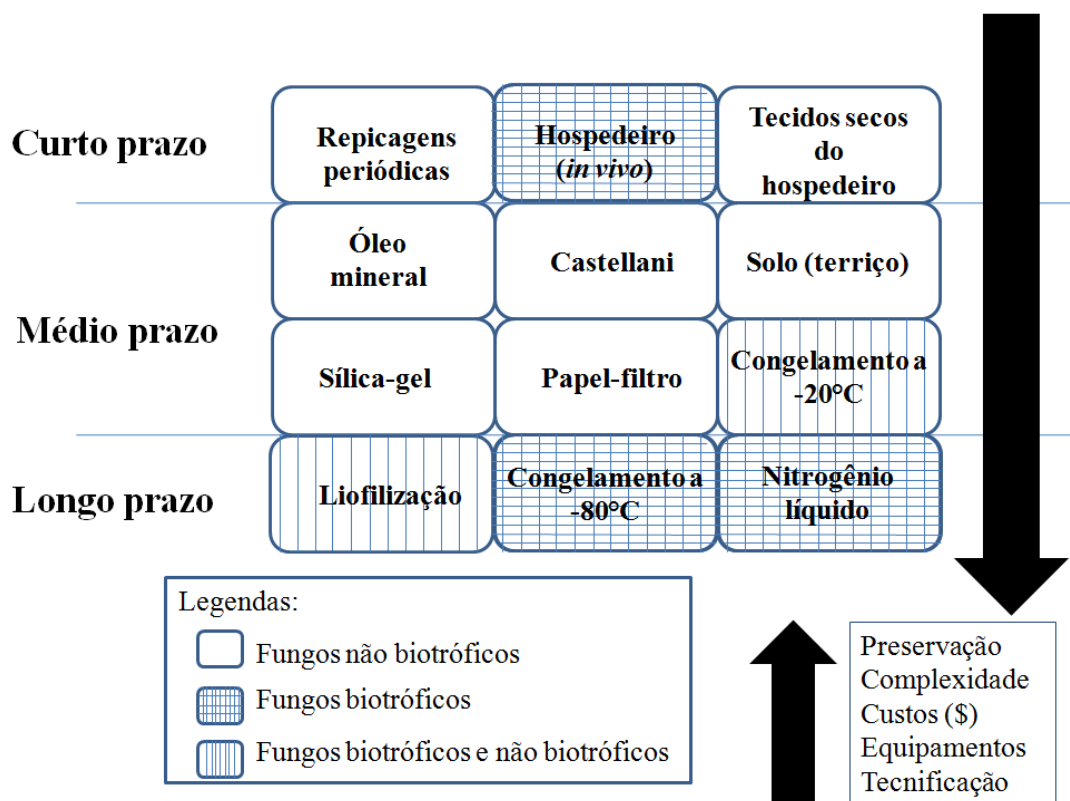


Figura 1. Métodos de preservação utilizados para fungos. Fonte: BELOTI (2015).

Na Figura 1 observa-se que, à medida que são utilizados métodos de preservação de longo prazo, haverá maior estabilidade genética; entretanto, os custos com aquisição de equipamento e materiais, além da necessidade de mão de obra especializada, se elevam.

Métodos de crescimento contínuo para manter isolados apenas podem ser utilizados no curto prazo. As técnicas que reduzem os índices de metabolismo visam à preservação por médio prazo (oito a 20 anos), mas nem todos os isolados preservados sobrevivem (HAWKSWORTH et al., 1995). Nesse sentido, métodos que suspendem o metabolismo podem ser usados para preservar culturas por prazos maiores (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

A preservação de longo prazo supera algumas desvantagens de se manter continuamente isolados em estado de crescimento (métodos convencionais de curto e médio prazo). Métodos de crescimento contínuo muitas vezes podem levar à perda de patogenicidade, assim como a mudanças em características morfofisiológicas nas

culturas que permanecem suscetíveis à contaminação por ácaros presentes no ambiente. A constante supervisão de um especialista se faz necessária para garantir que as culturas não estejam contaminadas ou apresentem subdesenvolvimento, onerando os custos (SMITH; ONIONS, 1994).

É de vital importância constatar a viabilidade pré e pós-armazenamento, independentemente da técnica utilizada. Protocolos experimentais de preservação de culturas fúngicas têm estabelecido que a viabilidade aceitável para a germinação e o desenvolvimento das células se encontra em uma taxa acima de 75% (SMITH; RYAN, 2003). Para determinação da viabilidade, o meio de cultivo Batata Destrose Agar (BDA) é considerado universal por suportar o crescimento da maioria dos fungos (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997).

2.4 Escolha do método

Cada patógeno apresenta comportamento diferenciado frente às técnicas empregadas (FURTADO et al., 2008). A escolha do procedimento mais adequado deve ser norteada pelas características do espécime em estudo, bem como pelas vantagens e desvantagens (QUINN et al., 2005). Aquele que for capaz de preservar esporulação e patogenicidade do maior número de gêneros e espécies possíveis será o mais confiável, passando a ter maior preferência de uso sobre os demais (APARECIDO; CAMILO, 2003).

A maior preocupação no tocante à preservação reside nos efeitos sobre a estabilidade ao longo do tempo (HOLLAND et al., 2003). Dessa maneira, a escolha dependerá da infraestrutura do laboratório, do microrganismo em estudo, dos objetivos do trabalho e da preferência do pesquisador (ALFENAS; MAFIA, 2007), além das particularidades do agente, das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo e, principalmente, da disponibilidade de equipamentos (ABREU e TUTUNJI, 2003; GIRÃO et al., 2004) (Figura 2). A variabilidade das populações microbianas também determina a comparação experimental em relação a melhor temperatura e período de tempo para condições específicas (SOLA et al., 2012).

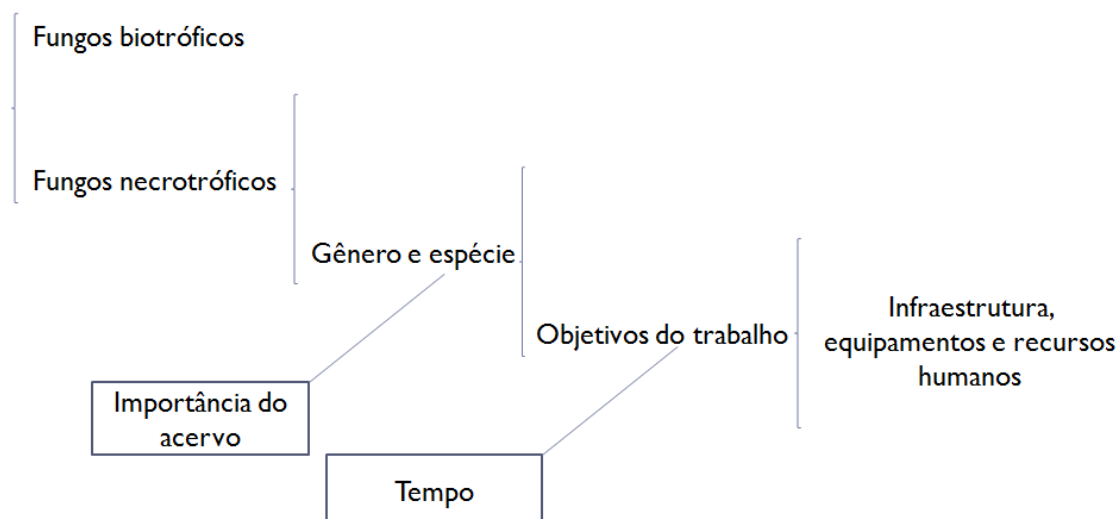


Figura 2. Esquema para a escolha dos métodos de preservação. Fonte: BELOTI (2015)

No que tange aos fatores conhecidos que influenciam a estabilidade, se destacam: (a) uso e tipos de crioprotetores; (b) variações de temperatura entre a coleta e o processamento do material, bem como no decorrer do processo de estocagem; (c) tempo despendido entre o processamento primário e a estocagem; (d) ausência de contaminação por ocasião da coleta e do processamento; (e) atividade de agentes endógenos de degradação ou de substâncias inibidoras na própria amostra (HOLLAND et al., 2003).

2.5 Métodos de preservação de fungos necrotróficos em curto prazo

2.5.1 Repicagens periódicas

A repicagem periódica, repique contínuo ou subcultivo é uma das técnicas mais antigas, tendo sido bastante utilizada devido à sua simplicidade (COSTA; FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006). Ela consiste em repicar partes jovens de micélio (áreas mais periféricas) para outro meio de cultivo, visando o crescimento e a esporulação do fungo. Preferencialmente utilizam-se tubos de ensaio devido à facilidade de transporte, ao fato de ocuparem menor espaço e possuírem superfície exposta bem menor em relação à placa de Petri, estando menos sujeitos a contaminações (ALFENAS; MAFIA, 2007). Passador et al. (2010) preconizam, para a preservação de fungos, o uso de esporos, e

não de micélios durante a repicagem, visto que os esporos são mais propícios a manter as características genéticas originais durante o processo de estocagem.

A idade das culturas influencia de forma significativa no emprego desse método, pois culturas velhas tendem a produzir culturas-filhas alteradas, do ponto de vista morfofisiológico e genético (GIRÃO, 2004). A fim de minimizar esses problemas, é necessário transferir apenas porções jovens esporulantes e homogêneas da colônia, sendo que, para trabalhos realizados em um semestre, esse método pode ser utilizado com sucesso (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Os meios de cultivo BDA e Extrato de Malte Ágar (MEA) são os mais utilizados, embora outros meios específicos sejam requeridos, dependendo da espécie. Após a colonização, devem ser mantidos em temperatura que favoreça o crescimento do fungo até que se colonize todo o meio de cultivo e, posteriormente, em baixa temperatura (5 a 10 °C), buscando a redução da atividade metabólica. Nesse caso, os tubos de ensaio devem ser mantidos com tampões de algodão hidrófobo, evitando-se contaminações; e as placas de Petri precisam ser vedadas com película de plástico (ALFENAS; MAFIA, 2007). Para minimizar o efeito da desidratação, os isolados são mantidos em tubos de ensaio com tampa rosqueável ou selados com parafina em ambientes protegidos da luz e de variações de temperatura, preferencialmente na faixa entre 5 e 8 °C (MURRAY, 2003).

O tempo mínimo de preservação, em curto prazo, em meio de cultivo sem repicagem é de 30 dias, embora existam isolados que não suportem esse período em tubos de ensaio ou placas de Petri contendo meio apropriado. Nesse caso, recomenda-se proceder à preservação em médio e longo prazo, imediatamente após a obtenção da cultura pura (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Nesses termos, o tempo de repicagem das culturas varia conforme o fungo, o meio de cultivo, a umidade e a temperatura de armazenamento – quando em meio inclinado e a 4 °C, são usualmente repicadas a cada seis meses (ALFENAS; MAFIA, 2007). A repetição do processo para novos meios deve ser realizada em intervalos de tempo condizentes com as necessidades e particularidades de cada isolado, avaliando-se as condições ótimas e o período máximo de sobrevivência entre os diferentes isolados. Assim, a transferência de culturas precisa ser feita antes que o substrato do meio seja

totalmente utilizado pelo fungo ou que se desidrate (BARKER, 2002; ROMEIRO, 2006).

O acúmulo excessivo de produtos de excreção, provenientes do metabolismo fúngico, pode provocar crescimento micelial lento e levar a alterações morfofisiológicas – tais substâncias se comportam como agentes mutagênicos; assim, a repicagem deve ser realizada a cada três ou quatro meses visando reduzir esse risco. Essas alterações podem ser decorrentes da constante manipulação exigida pelo método, dado que regularmente uma pequena porção de fungo precisa ser transferida para um novo tubo (FIGUEIREDO et al., 1980; PIRES et al., 2012).

Além de laboriosas, as repicagens periódicas tendem a induzir o patógeno ao hábito saprofítico, à alteração de sua morfologia, à diminuição ou perda de sua capacidade de esporular, à diminuição de sua agressividade, à perda da patogenicidade (ALFENAS; MAFIA, 2007) e a um grande consumo de tempo e pessoal (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Sua logística é inconveniente quanto à postagem para intercâmbio de isolados entre solicitante e remetente (ROMEIRO, 2006).

2.5.2 Tecidos secos do hospedeiro

Neste método, tecidos com sintomas típicos da doença, como folhas, colmos e caules, são desidratados em prensas de madeira por aproximadamente uma semana e à temperatura ambiente. Fungos que infectam colmo e caule de plantas podem ser preservados por períodos que variam de dois a oito anos, desde que sejam mantidos em condições adequadas. As folhas são armazenadas em envelopes devidamente etiquetados e mantidos a 5 °C e, em condições assépticas, transferem-se os esporos para um meio adequado ao crescimento da espécie. Quando necessário, são retirados pequenos segmentos do tecido infectado para a câmara úmida, induzindo a esporulação (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997; TUITTE, 1969).

De fato, é uma técnica na qual o organismo pode ser mantido íntegro durante um ano ou mais, com as vantagens de possuir baixo custo e requerer pouco espaço (BASTOS, 2008).

2.6 Métodos de preservação de fungos necrotróficos em médio prazo

2.6.1 Água estéril (Castellani)

Este método foi criado por Castellani (1939) para a preservação de fungos de interesse médico dos gêneros *Candida*, *Geotrichum* e *Cladosporium*. O organismo é cultivado em meio contendo ágar por tempo suficiente e que permita a retirada de discos de cultura, armazenando-os em frascos de vidro contendo água destilada esterilizada ou em solução de NaCl a 0,85% (ALFENAS; MAFIA, 2007).

O método Castellani foi introduzido no Brasil em 1966 pelo Instituto Biológico, sendo utilizado em todo o país até os dias atuais (APARECIDO; CAMILO, 2013). Ele é indicado na preservação de fungos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas (PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989; COSTA; FERREIRA, 1991; NEUFELD; OLIVEIRA, 2008).

Tal procedimento consiste em armazenar pequenos discos (7 mm) do fungo em frascos de vidro contendo aproximadamente 4 mL de água destilada esterilizada. Culturas jovens, com cerca de 10 a 15 dias, devem ser preferencialmente utilizadas (PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989). Segundo Pimentel et al. (1981), após a transferência da cultura para o frasco, este é tampado com rolha de borracha previamente esterilizada e permanece, durante alguns dias, sob observação, para ser verificada a possibilidade de contaminação durante a transferência. Não havendo contaminações com bactérias que se manifesta pela opacidade da fração líquida, o frasco é lacrado com uma tampa hermética de alumínio, evitando a desidratação. Pode-se utilizar algodão hidrófobo como tampão.

Para Oomycetes do gênero *Pythium* sp., há uma variação nessa técnica que consiste em introduzir sementes de linho em água deionizada. Após a repicagem de discos de micélio contendo o isolado para os frascos, estes são mantidos em ambiente escuro e em temperatura de 15 a 25 °C. *Pythium* sp. permaneceu preservado em tal método por cinco anos (SINGLETON et al., 1992).

As chances de sucesso do método aumentam com a transferência da amostra preservada para o meio de cultivo e as inoculações em hospedeiro original a cada cinco anos, aproximadamente. Esse procedimento reativa a fisiologia do microrganismo, podendo garantir a manutenção das características originais por mais um período de

preservação em laboratório; entretanto, há a possibilidade de contaminação e alteração dos isolados (PIRES et al., 2012).

Por serem pouco manuseadas, permanecendo o micélio em estado de latência, as culturas têm a probabilidade de mutações reduzida (PIRES et al., 2012). As contaminações por ácaros micófagos diminuem; logo, tal método é prático, simples, de baixo custo (por utilizar somente água estéril) e aplicável à grande diversidade de fungos, sendo que necessita de espaço físico reduzido para o acondicionamento dos isolados (PASSADOR et al., 2010; APARECIDO et al., 2012).

Apesar do baixo custo e reprodutibilidade, sua aplicação é restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar, como pode ser notado em alguns Deuteromycetes dos gêneros *Penicillium* e *Rhizopus* (ABREU; TUTUNJI, 2003).

Há relatos de preservação de fungos que habitam o solo com sucesso por esse método, como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Trichoderma* spp. e *Sclerotium cepivorum* (FIGUEIREDO, 1967; SINGLETON et al., 1992; DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

2.6.2 Óleo mineral

Esse método foi introduzido na fitopatologia nos anos de 1940 (BUELL; WESTEN, 1947). Seu princípio baseia-se em minimizar ou paralisar a multiplicação do fitopatógeno sob o óleo, reduzindo a disponibilidade de oxigênio (O₂). Para isso, colônias do fungo, após crescerem em frascos contendo meio agarizado, são cobertas com óleo mineral esterilizado e mantidas à temperatura ambiente ou em 5 °C, sofrendo ajustes mediante as necessidades individuais de cada agente. Espera-se um crescimento lento na primeira repicagem, isto é, na reativação de crescimento da cultura (ALFENAS; MAFIA, 2007). O cultivo de isolados deve ser em meio inclinado; após a observação de crescimento no meio de cultivo, adiciona-se o óleo de forma asséptica, limitando uma altura de um a dois centímetros acima do ponto mais alto do meio inclinado (ROMEIRO, 2006). Nesse caso, a transferência de culturas deve ser feita para o mesmo meio de cultivo em que o microrganismo se encontrava durante a preservação, e a retirada deste precisa acontecer após a drenagem total da camada de óleo (PEREIRA, 2008; PASSADOR, 2010).

A manutenção de culturas submersas em óleo mineral reduz o consumo de oxigênio em torno de 10% em poucas horas. Camadas de óleo superiores a 1 cm não devem ser utilizadas, visto que é possível ocorrer a diminuição da viabilidade dos microrganismos em condições de total exaustão de oxigênio (COSTA; FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

Os óleos utilizados devem ser de boa qualidade e pureza, apresentar alta viscosidade, densidade relativa entre 0,8 e 0,9 à temperatura de 20 °C, como a parafina e vaselina líquida, e não devem conter produtos tóxicos. Outra preocupação sobre o uso de óleos neste método diz respeito ao processo de esterilização. Nesse procedimento, é preciso evitar a formação de umidade, para eliminar o risco de contaminação, e ter um controle da temperatura, pois sua elevação pode resultar na formação de produtos tóxicos (ROMEIRO; 2006). Os procedimentos para a esterilização do óleo são: autoclavagem a 1 atm por 30 minutos, seguida de secagem a 150 °C, ou aquecimento a 170 °C por uma hora (ROMEIRO; 2006).

Alfenas e Mafia (2007) ressaltam o uso de óleo mineral com elevado teor de pureza (Nujol), autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Em Cefar (2006), a autoclavagem não é técnica ideal, devendo ser realizada em forno Pasteur a 170 °C por uma a duas horas. Alternativamente, Lelliot e Stead (1987) recomendaram a autoclavagem a 121 °C e 15lb de pressão por 15 minutos, seguida de permanência em forno Pasteur a 100 °C por 12 horas para remoção de água.

Tal método evita a desidratação do fungo, isolando-o do contato com o ar e reduzindo ao mínimo seu metabolismo (PIRES et al., 2012), o que ocasiona maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica (CANHOS et al., 2004; COSTA et al., 2009). A sobrevivência de algumas espécies ocorre exclusivamente por esse procedimento barato que não necessita de equipamentos dispendiosos e permite longa viabilidade para alguns isolados, sendo que os ácaros não penetram nas culturas (SMITH e ONIONS, 1983). Pesquisadores relatam que fungos sobrevivem de um a cinco anos (COSTA; FERREIRA, 1991; ABREU; TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

Entretanto, algumas espécies podem sofrer alterações morfofisiológicas em relação à cultura original quando o fungo continua a crescer, embora lentamente, sob o óleo (PIRES et al., 2012). Certos isolados, por outro lado, são bastante sensíveis ao

óleo, não sobrevivendo à preservação nessas condições (ALFENAS; MAFIA, 2007). Esse método também apresenta desvantagens equivalentes à técnica de subcultivo, como a possibilidade de contaminações e de mutações, além de dificuldades com a utilização do óleo, sua esterilização e manuseio (CANHOS et al., 2004; COSTA et al., 2009). Crescimento retardado e perda da capacidade de esporulação podem ocorrer quando há transferência do fungo imerso no óleo para o meio de cultivo (SMITH; ONIONS, 1983).

2.6.3 Terriço

O método terriço consiste na indução e/ou preservação de estruturas fúngicas, como escleródios, clamidósporos e microescleródios, em frascos contendo solo esterilizado, com manutenção destes a baixa temperatura (4 °C) (BUENO, 2004). O procedimento descrito por Alfenas e Mafia (2007) consiste na adição de 1 mL de suspensão concentrada de esporos ou dez grãos de cereais colonizados pelo fitopatógeno em frascos contendo 5 g de solo (areia e argila) autoclavado a 121 °C/1 h por dois dias sucessivos. Seca-se o solo ao ar até atingir cerca de 20% de umidade (p/p), passando-o em peneiras de 2 mm de diâmetro e autoclavando-o a 121 °C/1 h por dois dias consecutivos. Em cada frasco insere-se a suspensão concentrada de esporos – o frasco deve ser tampado, homogeneizado e mantido por 15 dias à temperatura que favoreça o crescimento micelial. A tampa precisa ser coberta com película de plástico, efetuando o armazenamento em 4 a 5 °C ou à temperatura ambiente. Adaptações do método podem ser encontradas na literatura, como a adição de farelo de trigo ou grãos de aveia em solo argilo-arenoso, com bons resultados. Grandes coleções podem ser preservadas por esse método.

Para a classe Deuteromycetes, a inoculação do terriço pode ser realizada tanto a seco, com pequeno volume da suspensão de conídios que é absorvido rapidamente; como previamente umedecida, com a suspensão de conídios ou com um pequeno disco de ágar contendo as estruturas fúngicas. O umedecimento permite um crescimento inicial antes de o fungo entrar em dormência (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997).

Método de fácil execução, o terriço requer pouco espaço, possibilita a obtenção de grande quantidade de propágulos e garante viabilidade por muito tempo, com baixa

ocorrência de alterações morfológicas. Entretanto, ele é restrito a fungos habitantes do solo, como *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp., *Alternaria* sp., *Cochliobolus* sp., *Cylindrocladium* spp., *Cylindrocladiella* spp., *Falcocladium* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp., além de ser necessário minucioso processo de autoclavagem do substrato a ser utilizado, evitando-se contaminações (ALFENAS; MAFIA, 2007).

2.6.4 Estruturas de resistência em grãos

O método consiste em promover a colonização e formação de estruturas de resistência, como clamidósporos e escleródios, sobre os grãos. Estes, antes da colonização, são autoclavados a 121 °C/2 h por duas vezes, com intervalos de 48 horas dentro de frascos, vedados com rosca ou algodão hidrófobo; depois de incubados durante 30 dias sob a temperatura ótima de crescimento, são mantidos a 10 °C. Diversos fungos podem ser preservados em grãos de cereais (ex.: aveia, trigo, sorgo, etc.), mantendo sua viabilidade e patogenicidade por períodos de dez anos ou mais (ALFENAS; MAFIA, 2007), a exemplo dos isolados de *R. solani* (SINGLETON et al., 1992; CARLING; SUMNER; 1992).

2.6.5 Papel-filtro

O método consiste em inserir fragmentos de papel-filtro (1 cm²) estéreis em placas de Petri com o micélio. Após a colonização dos fragmentos de papel, estes são transferidos para placas estéreis, deixando-os secar em incubadoras a 25 °C por dez dias. Os fragmentos de papel contendo micélio são transferidos para envelopes de papel-pardo esterilizados ou frascos do tipo penicilina, sendo mantidos a -20 °C ou -80 °C (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Um método modificado foi desenvolvido por Fong et al. (2000) e consiste em inserir discos de hifas fúngicas sobre o papel-filtro em placas de Petri contendo meio BDA; na sequência, as placas são seladas com uma película de plástico e mantidas a 28 °C sob escuridão total em incubadora tipo BOD. Para a maioria das espécies fúngicas, o micélio irradia-se pelo papel-filtro depois de sete dias; após esse período, os discos são

retirados, evitando-se a presença de meio, o que facilita o processo de secagem. O papel-filtro é inserido em uma placa de Petri estéril e mantido em exsiccador contendo sílica-gel conectado a uma bomba de pressão negativa. São necessárias, no mínimo, 15 horas para a secagem de 10 papéis. As tiras de papel-filtro são inseridas em frascos estéreis vedados e mantidos em -19 °C. Para a recuperação de fungos, estes devem ser incubados em condições ótimas de crescimento anteriores à preservação (plaquear os fragmentos de papel em meio BDA), e os fragmentos de micélio em papel-filtro precisam ser adequadamente desidratados – as culturas são recuperadas de sete a 10 dias.

Quando comparado com os métodos de desidratação-congelamento convencionais, o papel-filtro é mais simples, menos oneroso e requer apenas um exsiccador e uma bomba de pressão negativa, além de refrigerador ou freezer doméstico. Culturas preservadas usando esse protocolo podem ser tão estáveis como os isolados preservados por liofilização. Para a preservação de pequena escala de culturas em laboratório, é menos dispendioso do que o nitrogênio líquido e permite o intercâmbio de amostras entre laboratórios, por ser facilmente transportado (FONG et al., 2000).

2.6.6 Sílica-gel

O princípio deste método se baseia na diminuição do metabolismo fúngico via desidratação e baixa temperatura. A sílica-gel de 10 mesh sem indicador de pH é preferencialmente utilizada, devendo ser esterilizada em forno Pasteur a 180 °C por 90 minutos e acondicionada em frascos (metade do volume). Em cada frasco adiciona-se uma suspensão concentrada de esporos (10^8 /mL) em leite desnatado 5 ou 10% (agente protetor previamente esterilizado). Os frascos são agitados e mantidos em gelo por 30 minutos. Como a sílica libera calor quando umedecida, deve-se tomar cuidado por ocasião do preparo da suspensão de esporos. As culturas são mantidas por sete dias à temperatura ambiente, avaliando-se a sua viabilidade; posteriormente, são inseridas em exsiccador a 5 °C (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997).

Recomenda-se o uso deste método quando as técnicas de liofilização ou nitrogênio líquido forem inadequadas (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Entre as vantagens está o fato de ser simples, econômico e resultar em culturas estáveis.

Entretanto, é limitado a fungos esporulantes e inadequado para os Oomycetes, como *Pythium* sp. e *Phytophthora* sp. (MENEZES et al., 1997).

2.6.7 Congelamento

O congelamento consiste na preservação em temperaturas relativamente baixas, entre -4 e -20 °C (TORTORA et al., 2011). Esse método é usado somente para fungos que suportam o retorno para a temperatura ambiente após serem mantidos em temperaturas inferiores a -20 °C (DHINGRA e SINCLAIR, 1995). Esporos, escleródios e micélio dormente são as estruturas fúngicas que mais sobrevivem ao processo de congelamento, visto que apresentam teor de umidade menor em relação ao micélio. As células com maior teor de umidade tendem a ser mais suscetíveis aos danos causados pelo congelamento (MERYMAN, 1966).

É um método simples, pouco oneroso, não requer equipamentos sofisticados, nem mesmo no preparo do material (SOLA et al., 2012), além de oferecer boa segurança para a preservação de diversos microrganismos por períodos de alguns meses a dois anos (TORTORA et al., 2011). Entretanto, em função dos danos causados às células, existe a possibilidade de redução da viabilidade, decorrente da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (ROMEIRO, 2006). Tal fato pode ser contornado com o uso de crioprotetores e modificações na técnica inerentes à espécie a ser preservada (ALFENAS; MAFIA, 2007).

2.7 Métodos de preservação de fungos necrotróficos em longo prazo

2.7.1 Liofilização

Várias coleções de culturas dependem deste processo para garantir e preservar a diversidade de seus espécimes; por isso, tem sido utilizado como método de referência para a preservação por longo prazo (ABREU; TUNTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009). Ele consiste na preservação de culturas pela dessecação rápida em estado de congelamento (PITTOMBO, 1989), a partir da remoção de água intracelular de materiais biológicos (previamente congelados) por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo (capazes de provocar danos às estruturas celulares) e a degradação de

enzimas presentes no citosol, o que poderia levar à morte dos isolados (MORGAN et al., 2006).

A metodologia de Pittombo (1989) consiste em gotejar a suspensão de esporos sobre tiras de papel-filtro no interior de ampolas de vidro. Essas amostras são acopladas ao aparelho liofilizador e submetidas a condições de vácuo e temperaturas que variam de -40 °C a -50 °C, para rápido congelamento. Ampolas ou frascos de vidro devem ser acondicionados em ambiente com baixa umidade, baixa temperatura (até -20 °C), ausência de oxigênio, luz e contaminantes. Quanto ao transporte de culturas de referência ou até mesmo materiais de rotina, o liofilizado pode ser transportado a longas distâncias em temperatura ambiente, não havendo a necessidade de refrigeração (MORGAN et al., 2006). Durante o processamento, grande número de células não sobrevive, mas aquelas que permanecem viáveis são o suficiente para preservar a cultura.

Nesses termos, a eficiência do método pode ser aumentada adotando-se procedimentos inerentes a um ou outro patógeno. Segmentos de folhas moídas com presença de sinais dos patógenos (veiculados a uma solução protetora) são também preservados com sucesso. A idade das células a serem liofilizadas e o meio em que foram cultivadas influenciam no sucesso do método (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Considerando a importância da preservação por longos períodos, Polge et al. (1949), na tentativa de prevenção ou até mesmo de redução dos efeitos adversos dos métodos de preservação de amostras biológicas, por uma descoberta acidental verificaram a proteção efetiva do glicerol sobre materiais biológicos. Posteriormente, a ação protetora de outras substâncias foi descoberta e intensamente empregada na rotina laboratorial, como o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol e o etilenoglicol (BAATI et al., 2000; HUBALEK et al., 2003).

Os meios protetores devem ser utilizados eventualmente para o preparo da suspensão do fungo, evitando modificações no processo de liofilização. Normalmente são usados o leite desnatado, o soro bovino ou uma solução a 1% de lactose, glucose ou sacarose (MENEZES et al., 1997) – estas podem ser adicionadas durante o desenvolvimento micelial, antes do congelamento ou da secagem. A escolha varia conforme o alvo da liofilização: compostos como glicerol, betaína, adonitol, glicose, lactose, trealose e alguns polímeros (dextran e polietilenoglicol, por exemplo) podem

oferecer proteção para muitas espécies (HUBÁLEK, 2003; PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

A liofilização é constituída por três etapas: (a) congelamento, (b) desidratação primária e (c) desidratação secundária. Durante o processo de congelamento, pode ocorrer dano à estrutura celular relacionado com o comportamento peculiar da água em condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar e, no processo de fusão, tende a recrystalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula (CARVALHO, 2007). Nesse sentido, a liofilização é capaz de causar injúrias ou danos celulares, além de alterar a permeabilidade da membrana celular, levando ao aumento da sensibilidade a alguns agentes seletivos, ao aumento da fase de latência (ou fase lag) de multiplicação celular e à necessidade de incremento nutricional (ABREU; TUNTUNJI, 2003; CANHOS et al., 2004).

Vale ressaltar que a referida técnica evita a contaminação por ácaros (principalmente dos gêneros *Tyroglyphus* e *Tarsonemus*), diminui a variação de linhagens, necessita de espaço bastante reduzido e não requer o monitoramento nem a manutenção frequente (CAPUCHO et al., 2005; PIRES et al., 2012; SOLA et al., 2012). Ela é considerada eficiente para a preservação de microrganismos, por garantir a viabilidade dos agentes por 17 a 20 anos e ser aplicável para a maioria deles, com exceção de algas e protozoários (COSTA; FERREIRA, 1991; CANHOS et al., 2004; PASSADOR et al., 2010).

Tal método restringe-se a fungos esporulantes, desde que seus esporos sejam resistentes, pois estruturas demasiadamente delicadas não suportam o processo, sendo esta a principal desvantagem da técnica (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1977; PITOMBO, 1989). Embora alguns gêneros sejam capazes de produzir estruturas de resistência, esse processo pode ser tão agressivo, mesmo que elas sobrevivam, resultando na perda das amostras (PIRES et al., 2012).

Há controvérsias sobre a seleção de células durante o processamento e as mudanças em características morfofisiológicas de alguns fungos. Constitui-se, assim, o processo de maior dificuldade para execução, requerendo conhecimento e domínio da técnica (ALFENAS; MAFIA, 2007), com a necessidade de equipamentos onerosos para a desidratação do material e elevados custos para o preparo das culturas (SOLA et al.,

2012). Essa técnica demanda grande consumo de tempo e constante necessidade de otimização de protocolos específicos para cada tipo de célula e espécime (PAOLI, 2005; MORGAN et al., 2006).

2.7.2 Criopreservação

O princípio do congelamento-descongelamento se encontra entre os mais importantes e funcionais para a preservação celular (COSTA et al., 2009). Ele compreende a manutenção de materiais a baixas temperaturas (-20 °C a -80 °C) em freezers e ultrafreezers, e a ultrabaixas temperaturas (-196 °C) em nitrogênio líquido (WOLFE; BRYANT, 2001; PAOLI, 2005). O material biológico deve ser inicialmente acondicionado à temperatura ambiente numa etapa que não causa danos, desde que o material esteja diluído em meio adequado. Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, entre 19 °C e 8 °C, em que o material pode ser severamente lesado quando realizado de maneira inadequada. Pode ocorrer choque térmico, induzindo prejuízos irreversíveis como danos à membrana plasmática; aumento da permeabilidade, com consequente perda de íons e moléculas intracelulares; e redução do metabolismo (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007; COSTA et al., 2009).

A efetividade na criopreservação depende de uma série de fatores, como: espécie à qual pertence, tipo de cepa, tamanho e estrutura celular, fase e taxa de desenvolvimento, temperatura de incubação, composição do meio de cultivo, pH, osmolaridade, aeração, teor de água da célula, teor lipídico, composição do meio de congelamento, taxa de resfriamento, temperatura, tempo de estocagem, taxa de aquecimento e meio de recuperação (COSTA et al., 2009).

Em relação à taxa de resfriamento, quando os materiais biológicos a serem preservados são submetidos ao resfriamento lento, ocorre redução gradativa da temperatura, estabelecendo uma curva extremamente rápida, capaz de prevenir injúria celular, e, ao mesmo tempo, lenta o suficiente para permitir um nível de desidratação capaz de evitar a formação de gelo intracelular. A vitrificação compreende o uso de taxas de resfriamento extremamente altas, porém a adição de crioprotetores em altas concentrações reduz a quantidade de água antes do resfriamento, impedindo assim a

formação de cristais de gelo e os consequentes danos estruturais (COSTA et al., 2009; SPUTTEKA; ROWEB, 2011).

Quando o processo de redução de temperatura atinge a faixa de -6 °C a -15 °C são verificados a cristalização da água presente no meio, o aumento da concentração de soluto na fração descongelada e a ausência de formação de cristais de gelo intracelular pelo controle da membrana plasmática. Quando o material atinge a temperatura crítica de -60 °C constata-se a inércia celular, sendo possível imergir o material em nitrogênio líquido para seu armazenamento e preservação (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007).

Danos podem ocorrer durante o resfriamento na faixa de 19 °C a 8 °C, quando os lipídios que compõem a membrana plasmática passam por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para um estado gelatinoso. Quando esse resfriamento é realizado de forma inadequada, o choque térmico provoca danos irreversíveis e letais conhecidos como crioinjúrias, a exemplo das alterações na membrana plasmática, com consequente aumento da permeabilidade e perda de íons e moléculas intracelulares, além da redução do metabolismo (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007; COSTA et al., 2009).

O congelamento é um processo probabilístico e, na maioria dos casos, a solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular. Por essa e outras razões, o congelamento extracelular tende a ocorrer primeiro. Quando isso acontece, os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água em estado líquido, que passa a exibir maior pressão osmótica – esse mecanismo promove o fluxo de água para fora da célula. A alta concentração intracelular inibe a formação de gelo, mas a desidratação e a elevada contração de íons podem ser severas o bastante para causar danos (WOLFE; BRYANR, 2001; HUBALEK, 2003).

Embora a eficiência da preservação em temperaturas ultrabaixas seja garantida, Vysekantsev et al. (2005) sugeriram que alterações cíclicas da temperatura de -196 °C até -130 °C ou -100 °C resultariam na morte dos organismos. Dessa forma, ressalta-se o cuidado ante a movimentação e o transporte de exemplares criopreservados.

2.7.2.1 Nitrogênio líquido

Tem sido considerada a melhor e mais amplamente aplicável técnica disponível para a preservação de fungos filamentosos (SMITH, 1998). Seu sucesso depende do espécime em suportar o resfriamento e o subsequente congelamento a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o descongelamento no ato de recuperação da cultura. Na teoria, quando resiste às mudanças de temperatura, ele permanece viável indefinidamente, e, com essa técnica, o isolado mantém as características morfofisiológicas e sua patogenicidade.

As ampolas de vidro, polipropileno e os recipientes de borossilicato podem ser utilizados se forem selados. Fragmentos do hospedeiro colonizados pelo patógeno podem ser empregados para vários fitopatógenos, como espécies de *Peronospora* spp., *Diplocarpon* spp. e *Macrophomina* spp. Para espécies de *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp., é necessário colher discos de micélio com meio de cultivo e colocá-los em frascos, não sendo recomendado o uso de suspensões de células (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Neste método, a atividade metabólica dos fungos fitopatogênicos é muito baixa, sendo que o nitrogênio líquido não influencia as características morfológicas e patogênicas deles (SINGLETON, 1992). Este método garante a preservação em temperaturas constantes e por longos períodos (WOLFE; BRYANT, 2001; PAOLI, 2005). Vale ressaltar que essa técnica é dispendiosa por requerer a reposição regular do nitrogênio no nível ideal e exigir um local com ventilação adequada para o armazenamento do tambor (FONG et al., 2000; CAPUCHO et al., 2005).

2.7.2.2 Ultracongelamento

A preservação de microrganismos veiculados em um meio protetor (ou não) a temperaturas de até $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ define seu princípio (ALFENAS; MAFIA, 2007). Nesse caso, os isolados se desenvolvem em placas de Petri com meio de cultivo BDA e, após sete dias, é preparada uma suspensão com as estruturas fúngicas adicionando-se à placa um pequeno volume de água destilada esterilizada. A seguir, tiras de papel de filtro são mantidas em contato com a suspensão para que esta seja totalmente absorvida. Posteriormente, elas são retiradas e inseridas em nova placa de Petri estéril, permanecendo em estufa de secagem por oito a dez dias, a $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na sequência, as

tiras são transferidas para criotubos distribuídos em caixas para ultracongelamento e mantidas em ultrafreezer a -80 °C (APARECIDO et al., 2013). Tecidos do hospedeiro com sinais do patógeno podem ser congelados diretamente, com sucesso de preservação variável de até 3,5 anos (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Meios de cultivo que estimulem os microrganismos a produzir estruturas de resistência em grande quantidade podem ser empregados. Assim, o sucesso da preservação sob ultracongelamento poderá ser maior, como o meio V8 utilizado para induzir à formação de quantidade considerável de oósporos em *Pythium* sp. e *Phytophthora* sp., aumentando a viabilidade perante o ultracongelamento, visto que os zoósporos (produzidos em meio de cultivo BDA) são estruturas extremamente delicadas e não suportam a técnica (APARECIDO et al., 2013).

A estocagem a baixas temperaturas, apesar de eficiente, pode comprometer a qualidade das amostras, em razão da possibilidade de variações de temperaturas em freezers (WOLFE; BRYANT, 2001; PAOLI, 2005).

Exemplos de gêneros e espécies preservadas pelos diferentes métodos abordados se encontram anexo desta dissertação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados utilizados neste estudo foram obtidos no Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP), localizado no Instituto de Ciências Ambientais e Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (ICIAG/UFU) – *Campus* Umuarama, e no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF/ICIAG/UFU) – *Campus* Monte Carmelo.

A micoteca do LAMIP possui isolados fúngicos preservados pelos métodos: terriço, estruturas de resistência mantidas em 4 °C, óleo mineral e gelatina. A maioria foi isolada a partir de plantas recebidas para análise, objetivando a emissão de laudo para identificar o agente causal e as medidas de manejo.

Uma pequena parte dos isolados é proveniente de coleções de outras instituições nacionais de pesquisa. Vale ressaltar que a micoteca do LAMIF contém isolados fúngicos preservados em sílica-gel.

3.1 Isolados preservados em terriço

O procedimento adotado pelo padrão de qualidade do LAMIP para este método consiste no preparo do terriço, em que se utilizam 50% de areia e 50% de argila previamente peneirados para obter granulometria de aproximadamente 20 mesh. Uma alíquota de 5 g é inserida em cada tubo de ensaio, lacrado com algodão hidrófobo. Os tubos contendo o terriço são autoclavados a 121 °C/Kgf cm² durante duas horas e por dois dias sucessivos. Pequenos discos dos isolados fúngicos crescidos em meio de cultivo BDA em placas de Petri (90 mm) são retirados através de tubos de cobre (5 mm de diâmetro) e com o auxílio de alça de platina – a repicagem em cada tubo é realizada a seco. Após 15 dias em temperatura que favorece o crescimento micelial (20 ± 2 °C) e o fotoperíodo de 12 horas em câmara climatizada, este é mantido em geladeira a 4-5 °C.

No LAMIP foram preservados 68 isolados pertencentes aos gêneros e espécies *Fusarium* spp., *F. solani*, *F. oxyporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *M. phaseolina*., *Rhizoctonia* spp., *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Verticilium* spp. em diferentes hospedeiros e datas de preservação (Tabela 1).

TABELA 1 Relação dos fungos preservados no LAMIP pelo método terriço. Uberlândia (MG), 2015. Fonte: BELOTI (2015)

CÓDIGO	PATÓGENO	HOSPEDEIRO	DATA DE PRESERVAÇÃO
LAMIP 010	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfectum</i>	Algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Dez/1998
LAMIP 011	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>G.hirsutum</i>	09/05/2001
LAMIP 012	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>G.hirsutum</i>	16/05/2001
LAMIP 013	<i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>G.hirsutum</i>	Fev/1999
LAMIP 014	<i>F. oxysporum</i>	Bananeira (<i>Musa</i> sp.)	15/05/1995
LAMIP 015	<i>F. oxysporum</i>	<i>Musa</i> sp.	03/05/2001
LAMIP 016	<i>F. oxysporum</i>	Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Dez/1995
LAMIP 017	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. vulgaris</i>	Dez/1996
LAMIP 018	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. vulgaris</i>	03/10/2001
LAMIP 019	<i>F. oxysporum</i>	Soja (<i>Glycine max</i> L.)	Jan/1999
LAMIP 020	<i>F. oxysporum</i>	<i>G. Max</i>	16/05/2001
LAMIP 021	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	Tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	05/07/2001
LAMIP 022	<i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	20/06/2001
LAMIP 023	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	03/10/1988
LAMIP 024	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Dez/1996
LAMIP 025	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	13/11/2001
LAMIP 026	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	18/04/1990
LAMIP 027	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	18/04/1990
LAMIP 028	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	18/04/1990
LAMIP 029	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	20/06/2001
LAMIP 030	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	19/06/2001
LAMIP 031	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	13/11/2001
LAMIP 032	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	05/06/2001
LAMIP 033	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	24/09/2001
LAMIP 034	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	20/11/2001
LAMIP 035	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i>	19/06/2001

(...Continua...)

TABELA 1, Cont.

LAMIP 036	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i> raça 2	07/05/1997
LAMIP 037	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i> raça 2	25/04/1997
LAMIP 038	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i> raça 1	26/11/1992
LAMIP 039	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	<i>S. lycopersicum</i> raça 2	24/09/2001
LAMIP 042	<i>F. solani</i>	<i>G. Max</i>	Fev/1999
LAMIP 043	<i>F. solani</i>	<i>G. Max</i>	16/05/2001
LAMIP 044	<i>Fusarium</i> spp.	Maracujázeiro (<i>Passiflora</i> sp.)	Mar/1999
LAMIP 045	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	09/05/2001
LAMIP 046	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	20/11/2001
LAMIP 047	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	20/11/2001
LAMIP 061	<i>Rizoctonia</i> spp.	Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	Abr/2000
LAMIP 062	<i>Rizoctonia</i> spp.	Cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	23/05/2001
LAMIP 063	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>C.arabica</i>	10/01/2002
LAMIP 064	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>C.arabica</i>	15/05/1995
LAMIP 065	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>S. lycopersicum</i>	20/11/2001
LAMIP 066	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>S. lycopersicum</i>	05/06/2001
LAMIP 067	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>G. Max</i>	10/01/2002
LAMIP 068	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	16/11/1976
LAMIP 069	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	11/11/1993
LAMIP 070	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	03/12/1993
LAMIP 071	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	03/12/1993
LAMIP 072	<i>Rizoctonia</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	12/11/1993
LAMIP 073	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Pimentão (<i>Capsicum</i> annum)	Abr/1994
LAMIP 074	<i>S.rolfsii</i>	<i>C. annum</i>	Abr/1994
LAMIP 075	<i>S. rolfsii</i>	<i>C. annum</i>	23/05/2001
LAMIP 076	<i>S.rolfsii</i>	<i>C. annum</i>	05/06/2001
LAMIP 077	<i>Verticillium</i> spp.	<i>S. lycopersicum</i>	Dez/1996
LAMIP 078	<i>Verticillium</i> spp.	<i>S. lycopersicum</i>	10/01/2002
LAMIP 113	<i>F. oxysporum</i>	Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	22/10/2002

(...Continua...)

TABELA 1, Cont.

LAMIP 114	<i>Rhizoctonia</i> spp.	Canola (<i>Brassica napus</i> L. var. <i>oleifera</i>)	06/09/2005
LAMIP 116	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>G.hirsutum</i>	17/11/2003
LAMIP 117	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. sativum</i>	22/10/2002
LAMIP 118 ^a	<i>Fusarium</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	14/02/2003
LAMIP 118B	<i>Fusarium</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	14/02/2003
LAMIP 119	<i>Fusarium</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	15/01/2003
T1	<i>R. solani</i>	*S.I.	11/11/2006
T2	<i>Verticillium</i> spp.	S.I.	Out/2006
T3	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	S.I.	28/05/2008
T4	<i>Fusarium</i> spp.	<i>C.arabica</i>	10/08/2008
T5	<i>Verticillium</i> spp.	S.I.	21/08/2008
T6	<i>M. phaseolina</i>	S.I.	21/08/2008
T7	<i>S. sclerotiorum</i>	S.I.	23/03/2009

*S.I.: sem informações

3.2 Isolados preservados em óleo mineral

O procedimento adotado pelo padrão de qualidade do LAMIP para este método consiste em recobrir totalmente as colônias que cresceram em tubos de ensaio contendo meio de cultivo BDA inclinado com óleo mineral (vaselina líquida) previamente esterilizado por 15 minutos em autoclave (121 °C/Kgf cm⁻²). Elas são mantidas em geladeira a 4 °C.

Trinta e um isolados foram preservados no LAMIP, pertencentes aos gêneros e espécies *Cercospora zea-maydis*, *Diaporthe phaseolorum*., *Pyricularia* spp., *Colletotrichum* spp., *C. gloeosporioides*., *Fusarium* spp., *F. moniliforme*, *F. solani*, *Phyllosticta* spp., *Phoma* spp., *Cylindrocladium* spp., *Drechslera oryzae*, *Phomopsis* spp., *Ramularia* spp. e *Rhynchosporium* spp. em diferentes hospedeiros e datas de preservação (Tabela 2).

TABELA 2 Relação dos fungos preservados no LAMIP pelo método óleo mineral (vaselina). Uberlândia, MG. Fonte: BELOTI (2015)

Código	Nome do Fungo	Nome do Hospedeiro	Data de entrada
LAMIP 001	<i>Cercospora zeae-maydis</i>	Milho (<i>Zea mays</i> L.)	27/12/2001
LAMIP 002	<i>C. zeae-maydis</i>	<i>Z. mays</i>	13/12/2001
LAMIP 005	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>G. Max</i>	18/09/2001
LAMIP 006	<i>D. phaseolorum</i>	<i>G. Max</i>	13/12/2001
LAMIP 007	<i>D. phaseolorum</i>	<i>G. Max</i>	27/11/2001
LAMIP 008	<i>Drechslera oryzae</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	11/04/1997
LAMIP 009	<i>D. oryzae</i>	<i>O. sativa</i>	13/12/2001
LAMIP 041	<i>F. solani</i>	<i>G. Max</i>	13/12/2001
LAMIP 054	<i>Pyricularia</i> spp.	<i>O. sativa</i>	16/05/2001
LAMIP 050	<i>Phomopsis</i> spp.	Jiló (<i>Solanum gilo</i>)	06/09/1994
LAMIP 051	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>S. gilo</i>	27/11/2001
LAMIP 052	<i>Pyricularia</i> spp.	<i>O. sativa</i>	Ago/1993
LAMIP 053	<i>Pyricularia</i> spp.	<i>O. sativa</i>	27/11/2001
LAMIP 056	<i>Ramularia</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	06/06/2001
LAMIP 060	<i>Rhynchosporium</i> spp.	<i>G. Max</i>	27/11/2001
LAMIP 081	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>C.arabica</i>	13/03/2001
LAMIP 094	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>C.arabica</i>	Abr/2005
LAMIP 098 ^a	<i>Fusarium</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	Abr/2004
LAMIP 098B	<i>Fusarium</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	14/06/2004
LAMIP 099	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	<i>C.arabica</i>	Out/2002
LAMIP 102	<i>Phyllosticta</i> spp.	<i>Z. mays</i>	19/09/2005
LAMIP 115	<i>C. gloesporioides</i>	<i>C.arabica</i>	Out/2002
LAMIP 120	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>C.arabica</i>	01/02/2003
LAMIP 127	<i>C. gloesporioides</i>	<i>C.arabica</i>	Out/2002
LAMIP 131	<i>Fusarium</i> spp.	<i>G. Max</i>	24/10/2005
LAMIP 161	<i>F. moniliforme</i>	Cana (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	08/11/2005
LAMIP 162	<i>Colletotrichum</i> spp.	Cajú (<i>Anacardium occidentale</i>)	11/11/2005
LAMIP 163	<i>Fusarium</i> spp.	<i>C.arabica</i>	11/11/2005
LAMIP 164	<i>Phoma</i> spp.	<i>A. occidentale</i>	11/11/2005
LAMIP 165	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>G. Max</i>	18/11/2005
LAMIP 166	<i>Cylindrocladium</i> spp.	Eucalipto (<i>Eucalyptus</i> spp.)	18/11/2005

3.3 Isolados preservados em gelatina

O procedimento utilizado no LAMIP foi formulado por sugestão do Prof. Dr. Armando Takatsu, adaptando-se para espécies fúngicas o método de dessecação em bactérias (TAKATSU, 1985) – não há metodologia correlata na literatura para espécies fúngicas fitopatogênicas. O isolado é desenvolvido sobre meio de cultivo BDA até recobrir totalmente a placa de Petri (90 mm) (Figura 3A) por aproximadamente sete dias, para a maioria das espécies testadas. O micélio é recoberto sucessivamente com dextrose (5%) e gelatina (5%) por um minuto, esgotando-se os excedentes. O resultado foi dividido em fragmentos de 1 cm², com o auxílio de um bisturi previamente esterilizado em chama de lamparina. Esses fragmentos foram inseridos sob telas de alumínio de 4 cm² no interior de placas de Petri plásticas previamente perfuradas, para permitir trocas gasosas com a sílica-gel (Figuras 3B e 3C). A esterilização delas ocorreu em aparelho micro-ondas (700 W) por um período de 12 minutos em alta potência.

Os isolados foram mantidos no interior de um recipiente plástico contendo sílica-gel de 10 a 15 dias (Figura 3D). A sílica-gel foi previamente esterilizada em forno Pasteur, a 170 °C durante duas horas. A assepsia das placas e recipientes foi realizada em solução de hipoclorito de sódio 2,5% e álcool 70%, expostas à luz ultravioleta por 20 minutos em fluxo laminar. Após a secagem, os isolados foram inseridos em envelopes confeccionados em papel-alumínio e previamente esterilizados em autoclave (121 °C/20 minutos), sendo recobertos com papel Kraft e mantidos em geladeira a 4 °C (Figura 3E).

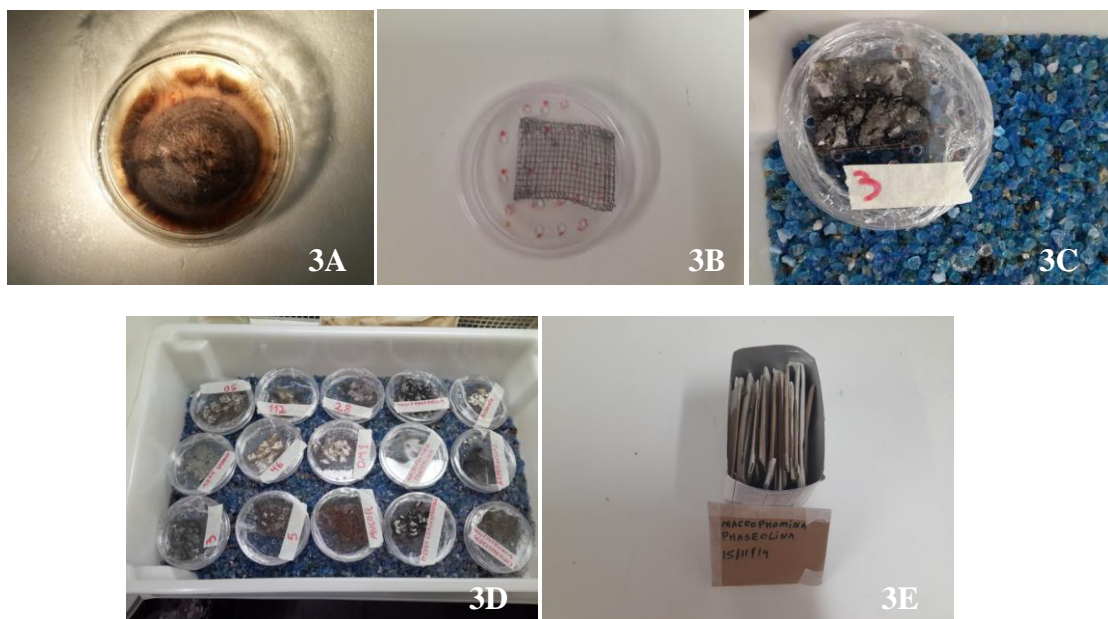


FIGURA 3. Procedimentos para a realização do método gelatina. Uberlândia, MG

No LAMIP foram preservados 17 isolados dos gêneros e espécies *Colletotrichum* spp., *Cladosporium* spp., *Septoria* spp., *Fusarium* spp., *F. subglutinans* f. sp. *ananas*., *Cylindrocladium* spp., *Macrophomina* spp., *Phomopsis* spp. e *Verticillium* spp. em diferentes hospedeiros e datas de preservação (Tabela 3).

TABELA 3. Relação dos fungos preservados no LAMIP pelo método gelatina. Uberlândia, MG. Fonte: BELOTI (2015)

Código	Nome do Fungo	Nome do hospedeiro	Data de entrada
LAMIP 132A	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	10/08/1999
LAMIP 132B	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	10/08/1999
LAMIP 132C	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	03/03/1998
LAMIP 133A	<i>Septoria</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	18/08/1998
LAMIP 133B	<i>Septoria</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	10/02/1999
LAMIP 134	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>C.arabica</i>	18/08/1998
LAMIP 134A	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>C.arabica</i>	06/09/2000
LAMIP 134B	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>C.arabica</i>	Jan/99
LAMIP 134C	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>C.arabica</i>	Jan/99
LAMIP 135	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Passiflora</i> sp.	03/03/1998
LAMIP 138	<i>Fusarium</i> spp.	Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	26/04/2002
LAMIP 140	<i>Fusarium</i> spp.	<i>G.hirsutum</i>	21/06/2004
LAMIP 167	<i>F. subglutinans</i> f. sp. ananas	Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	Jun/08
LAMIP 168	<i>Cylindrocladium</i> spp.	*S.I.	08/06/2008
LAMIP 169	<i>Macrophomina</i> spp.	S.I.	04/06/2008
LAMIP 170	<i>Phomopsis</i> spp.	S.I.	06/04/2008
LAMIP 171	<i>Verticillium</i> spp.	S.I.	04/06/2008

*S.I.: sem informações

3.4 Isolados (estruturas de resistência) preservados em 4 °C

Dez isolados de *S. sclerotiorum* foram preservados no LAMIP na forma de escleródios, sendo armazenados em envelopes de papel no interior de refrigerador (4 °C). Os isolados foram obtidos de diferentes hospedeiros, com datas de preservação distintas (Tabela 4).

TABELA 4. Relação dos escleródios (*S. sclerotiorum*) preservados em 4 °C no LAMIP. Uberlândia, MG. Fonte: BELOTI (2015)

Código	Nome do hospedeiro	Data de entrada	Local de coleta
LAMIP 172	<i>P. vulgaris</i>	2005	Capão bonito (SP)
LAMIP 173	Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	2007	Aparecida (MG)
LAMIP 174	*S.I.	1995	Taquarituba (SP)
LAMIP 175	S.I.	2010	Jataí (GO)
LAMIP 176	<i>G. Max</i>	2009	Luís Eduardo Magalhães (BA)
LAMIP 177	<i>P. vulgaris</i>	2006	São João da boa vista (SP)
LAMIP 178	<i>G. Max</i>	2008	Alfenas (MG)
LAMIP 179	<i>P. vulgaris</i>	2004	Capão bonito (SP) Pivô 1
LAMIP 180	<i>P. vulgaris</i>	2004	Capão bonito (SP) Pivô 2
LAMIP 181	S.I.	Fev/2009	São desidério (BA)

*S.I.: sem informações

3.5 Isolados preservados em sílica-gel

O procedimento adotado pelo padrão de qualidade do LAMIF para este método consiste em verter 5 mL de leite desnatado (10%), estéril, na superfície de colônias fúngicas puras, crescidas em placas de Petri. A adição do leite desnatado (10%) visa obter uma suspensão de inóculo (esporos e micélio) a partir da raspagem da superfície da colônia fúngica com alça de Drigalski, atuando como agente crioprotetor. Após a adição do leite desnatado estéril, são adicionadas tiras de papel-filtro estéril de aproximadamente 1 cm x 1 cm em placas de Petri, para embeber a suspensão obtida –

as tiras de papel são retiradas com o auxílio de uma pinça, para secagem do papel-filtro por 30 minutos. Frascos de vidro âmbar de 100 mL com tampa de plástico rosqueada são previamente preenchidos até 3/4 da sua capacidade com sílica-gel, com indicador de umidade de granulometria de 4 a 8 mm de diâmetro. A superfície da sílica-gel é coberta com papel-filtro de diâmetro igual ao do frasco, para receber as tiras de papel (Figura 3).

Os frascos contendo a sílica sem a tampa são esterilizados em estufa com circulação de ar a 180 °C por duas horas. As tiras de papel com inóculo previamente secas são transferidas para o interior dos frascos âmbar, lacradas com a tampa de plástico, e, em seguida, armazenados em refrigerador (4 °C).



FIGURA 4. Frascos âmbar contendo sílica e discos de papel, prontos para receber as tiras de papel com inóculo.

No LAMIF mantiveram-se preservados 14 isolados dos gêneros e espécies *Septoria* spp., *Alternaria sonchi*, *Rhizopus stolonifer*, *S. cepivorum*, *Curvularia* spp., *Bipolaris* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella* spp., *Cercospora* spp., *Penicillium lilacinum*, *M. phaseolina*, *C. gloeosporioides*, *Trichoderma* spp. e *Pseudocercospora* spp. (Tabela 5).

TABELA 5. Relação dos fungos preservados no LAMIF pelo método sílica-gel. Monte Carmelo, MG. Fonte: BELOTI (2015)

Código	Nome do fungo	Nome do hospedeiro	Data de entrada
LAMIF 001	<i>Septoria</i> spp.	*S.I.	07/02/2011
LAMIF 002	<i>Alternaria sonchi</i>	Almeirão (<i>Cichorium intybus</i>)	20/06/2013
LAMIF 003	<i>Rhizopus stolonifer</i>	S.I.	07/02/2011
LAMIF 004	<i>S. cepivorum</i>	S.I.	17/05/2013
LAMIF 005	<i>Curvularia</i> spp.	S.I.	06/08/2010
LAMIF 006	<i>Bipolaris</i> spp.	Capim Marmelada(<i>Brachiaria plantaginea</i>)	06/08/2010
LAMIF 007	<i>S. sclerotiorum</i>	S.I.	28/03/2013
LAMIF 008	<i>Mycosphaerella</i> spp.	S.I.	06/08/2010
LAMIF 009	<i>Cercospora</i> spp.	<i>Coffea arábica</i>	12/08/2013
LAMIF 010	<i>Penicillium lilacinum</i>	S.I.	10/06/2013
LAMIF 011	<i>M. phaseolina</i>	S.I.	06/04/2011
LAMIF 012	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Passiflora</i> sp.	26/04/2011
LAMIF 013	<i>Trichoderma</i> spp.	S.I.	28/03/2013
LAMIF 014	<i>Pseudocercospora</i> spp.	S.I.	07/02/2011

*S.I.: sem informações

3.6 Avaliação da viabilidade

Para a avaliação da viabilidade dos isolados, foram utilizados tubos de ensaios contendo meio de cultivo inclinado para o desenvolvimento micelial. Para os métodos terriço, óleo mineral, gelatina e sílica-gel, em cada tubo inseriram-se 3,5 mL de meio de cultivo BDA (pH 5,5), acrescidos dos antibióticos (0,5 mg/L) clorofenicol, estreptomicina e ampicilina, para minimizar contaminações bacterianas. As estruturas de resistência de *S. sclerotiorum* preservadas em 4 °C foram avaliadas pelo método modificado de Santos (2014), com o plaqueamento dos escleródios no meio semisseletivo Neon-S modificado.

Seis repetições foram utilizadas por isolado (uma repetição equivale a um tubo), para avaliar a viabilidade nos métodos terriço, óleo mineral e gelatina. Para o método sílica-gel, empregaram-se três tubos por isolado devido à baixa disponibilidade de amostras. Nos casos em que nenhum crescimento micelial nos tubos testados foi

observado ou ocorreu desenvolvimento de fungos contaminantes (principalmente *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp.), usou-se o meio de cultivo ágar-água (2%) em tubos de ensaio (pH 5,5).

No método terriço, a repicagem foi realizada a partir da distribuição de terriço em cada tubo, cobrindo a superfície do meio. No método óleo, inseriram-se pequenos fragmentos de micélio com o auxílio de uma alça de platina. O óleo contido no interior dos tubos de ensaio foi totalmente drenado para frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave (121 °C/20 minutos), para que, após a inoculação, pudessem retornar ao frasco original (tubos de ensaio), mantendo a integridade do isolado. No método de gelatina, pequenos fragmentos de gelatina foram inseridos nos tubos a partir do uso de pinças previamente esterilizadas em chama de lamparina. Após a repicagem, os tubos foram lacrados com algodão hidrófobo e mantidos em câmara climatizada (20 ± 2 °C), com fotoperíodo de 12 horas e por um período de 15 dias.

No caso das estruturas de resistência de *S. sclerotiorum* preservadas em 4 °C, utilizou-se o método adaptado de Ferraz (2001) e Santos (2014), em que foram modificados o tempo e a ordem na qual as estruturas se mantiveram nas soluções. Os escleródios foram mantidos um minuto em água destilada, um minuto em álcool 50% e três minutos em hipoclorito de sódio 1%, retirando-se o excesso em água destilada durante um minuto. Na sequência, os escleródios foram inseridos em tubos de ensaio contendo 3,5 mL de meio semisseletivo Neon-s modificado. Os tubos foram lacrados com algodão hidrófobo e mantidos em câmara de crescimento BOD a 20 °C, com ausência de luminosidade e por um período de 15 dias.

Quando nenhum crescimento micelial foi observado no meio de cultivo BDA ou ocorreu o desenvolvimento de fungos contaminantes, utilizou-se o meio de cultivo AA (2%) em tubos de ensaio com três repetições, 3,5 mL por tubo e pH 5,5.

Utilizou-se a câmara de fluxo, munida de lâmpada ultravioleta germicida, e, para a esterilização prévia, a chama de lamparina foi empregada. Os materiais foram previamente esterilizados em autoclave (calor úmido) ou forno Pasteur (calor seco).

A viabilidade foi avaliada diariamente para os métodos de preservação terriço, óleo mineral, gelatina e sílica-gel a partir da visualização do crescimento e desenvolvimento micelial em microscópio estereoscópico (40x), por 15 dias, com a

confirmação em microscópio ótico (400x). Para estruturas de resistência em 4 °C, após 15 dias incubados em BOD os tubos foram retirados observando-se mudanças na coloração. O método permite avaliar a sobrevivência do fungo, posto que o fungo viável modifique a coloração do meio de azul para um tom amarelo, pela produção de ácido oxálico, além da formação de micélio e escleródios característicos, o que facilita a diagnose visual (SANTOS, 2014).

3.7 Avaliação da esporulação

A esporulação, independentemente do número de esporos encontrados, foi avaliada a partir da observação em microscópio óptico (400x). Nesse contexto, a identificação foi realizada ao se observarem estruturas como micélio, conídios e esporos, confrontando-as com as descrições de Barnett e Hunter (1998), para correta identificação, além de ser verificada a presença de contaminantes.

3.8 Avaliação da colonização/patogenicidade

A avaliação da colonização/patogenicidade foi realizada a partir da inoculação em tecidos vivos do hospedeiro, frutos, tubérculos e vagens, como proposto por Menezes e Silva-Hanlin (1997). Utilizou-se o método de inoculação com palito (Figura 5) (ALFENAS; MAFIA, 2007).



Figura 5. Inoculação com palito

A limpeza dos tecidos foi feita com água corrente e sabão, e sua desinfestação, por meio da passagem, por um minuto, em soluções de hipoclorito de sódio 1,5%, álcool 50% e água destilada. Com o auxílio de bisturi e pinça, flambados, inocularam-se as estruturas fúngicas presentes nos palitos retirados de colônias jovens (sete dias) e puras. Os frutos, rizomas e vagens inoculados e não inoculados foram mantidos em câmara climatizada (20 ± 2 °C), com fotoperíodo de 12 horas e em sacos plásticos fechados durante sete dias.

Nesse caso, a quantidade de palitos foi padronizada para três, no caso de tecidos menores, como dos isolados provenientes dos frutos de *S. gilo*, *C. arabica*, vagens de *P. vulgaris* e *G. max*, bulbilhos de *A. sativum* e rizomas de *Z. officinale*; e nove palitos, em relação aos tecidos maiores, como dos isolados provenientes dos frutos de *A. comosus*, *Passiflora* sp., *C. annum*, *S. lycopersicum*, *Musa* sp. e tolete de *S. officinarum*. Para os fungos *Macrophomina* sp. (soja), *F. solani* (soja) e *F. oxysporum* (soja e feijão), avaliou-se a colonização nas sementes de soja (10 sementes/placa), em um micélio desenvolvido em placas de Petri contendo meio BDA.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da viabilidade, esporulação e colonização/patogenicidade

4.1.1 Método terriço

Dos 68 isolados preservados no método terriço, 38 permaneceram viáveis: cinco isolados de *Fusarium* spp. (até 13 anos e 40 dias), cinco isolados de *F. oxysporum* (até 18 anos e 328 dias), 16 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (até 25 anos e 186 dias), cinco isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (até 15 anos e 128 dias), um isolado de *F. solani* (12 anos e 343 dias) e um isolado de *S. rolfsii* (20 anos e 33 dias): LAMIP 073, produzindo escleródios. Cinco isolados foram identificados como viáveis apenas em meio de cultivo AA: *Fusarium* spp. (até 11 anos e 55 dias): 118A e 118B; e *Rhizoctonia* spp. (até 37 anos e 142 dias): LAMIP 061, LAMIP 067 e LAMIP 068 (Tabela 6).

Os isolados LAMIP 036, LAMIP 044, LAMIP 045, LAMIP 046 perderam sua capacidade esporulativa em meio de cultivo BDA (Tabela 6). Muitos fungos prosperam agressivamente nesse meio rico que incentiva o crescimento micelial vigoroso de fungos, mas pode levar a uma eventual perda de esporulação. Pode ser necessário um período de crescimento em um meio de privação de nutrientes para incentivar a esporulação (SMITH; ONIONS, 1994; DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Esses isolados apresentaram sintomas brandos nos tecidos colonizados ou crescimento micelial restrito.

Tabela 6. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA e AA preservados pelo método terriço. Uberlândia (MG). Fonte: BELOTI (2015)

Código	Patógeno	Esporulação	Colonização/ Patogenicidade	Sintomas/ Sinal	Tempo de Preservação
LAMIP 010	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	+	Maçã de algodão	Enegrecimento e crescimento micelial	15 anos e 128 dias
LAMIP 011	<i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	+	Maçã de algodão	Enegrecimento e crescimento micelial	12 anos e 332 dias
LAMIP 012	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	+	Maçã de algodão	Enegrecimento e crescimento micelial	12 anos e 328 dias
LAMIP 013	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	+	Maçã de algodão	Enegrecimento e crescimento micelial	15 anos e 66 dias
LAMIP 014	<i>F. oxysporum</i>	+	Banana	Podridão e crescimento micelial	18 anos e 328 dias
LAMIP 015	<i>F. oxysporum</i>	+	Banana	Podridão e crescimento micelial	12 anos e 340 dias
LAMIP 018	<i>F. oxysporum</i>	+	Feijão	Crescimento micelial abundante	12 anos e 186 dias
LAMIP 020	<i>F. oxysporum</i>	+	Vagem e semente de Soja	Crescimento micelial	12 anos e 329 dias
LAMIP 022	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 292 dias
LAMIP 023	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	25 anos e 186 dias
LAMIP 026	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	23 anos e 354 dias
LAMIP 027	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	23 anos e 354 dias
LAMIP 028	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	23 anos e 354 dias

(...continua...)

TABELA 6, Cont.

LAMIP 029	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 292 dias
LAMIP 030	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 292 dias
LAMIP 031	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 146 dias
LAMIP 032	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 307 dias
LAMIP 033	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 197 dias
LAMIP 034	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 139 dias
LAMIP 035	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 292 dias
LAMIP 036	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	-	Tomate	Podridão superficial e crescimento micelial	16 anos e 336 dias
LAMIP 037	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	16 anos e 350 dias
LAMIP 038	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	21 anos e 135 dias
LAMIP 039	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	+	Tomate	Apodrecimento e micélio abundante	12 anos e 197 dias
LAMIP 043	<i>F. solani</i>	+	Vagem e semente de Soja	Crescimento micelial	12 anos e 343 dias
LAMIP 044	<i>Fusarium</i> spp.	-	Maracujá	Crescimento micelial	13 anos e 40 dias
LAMIP 045	<i>Fusarium</i> spp.	-	Maracujá	Crescimento micelial	12 anos e 336 dias
LAMIP 046	<i>Fusarium</i> spp.	-	Maracujá	Crescimento micelial	12 anos e 139 dias
LAMIP 047	<i>Fusarium</i> spp.	+	Maracujá	Crescimento micelial	12 anos e 139 dias
LAMIP 061	<i>Rhizoctonia</i> spp.	A.	S.I.	S.I.	Aprox. 14 anos
LAMIP 067	<i>Rhizoctonia</i> spp.	A.	S.I.	S.I.	12 anos e 88 dias
LAMIP 068	<i>Rhizoctonia</i> spp.	A.	S.I.	S.I.	37 anos e 142 dias
LAMIP 073	<i>Sclerotium rolfsii</i>	ER	Pimentão	Podridão e micélio abundante	20 anos e 33 dias

(...continua...)

TABELA 6, Cont.

LAMIP 113	<i>F. oxysporum</i>	+	Alho	Manchas avermelhadas e micélio abundante	11 anos e 172 dias
LAMIP 116	<i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	+	Maça de algodão	Enegrecimento e crescimento micelial	10 anos e 146 dias
LAMIP 118A	<i>Fusarium</i> spp.	+	S.I.	S.I.	11 anos e 55 dias
LAMIP 118B	<i>Fusarium</i> spp.	-	S.I.	S.I.	11 anos e 55 dias
LAMIP 119	<i>Fusarium</i> spp.	+	Maça de algodão	Enegrecimento e crescimento micelial	11 anos e 88 dias

Inoculado para avaliação nos dias 8 e 9 de abril de 2014. (-) Não; (+) Sim; (ER) estruturas de resistência; (A) Agonomycetales.



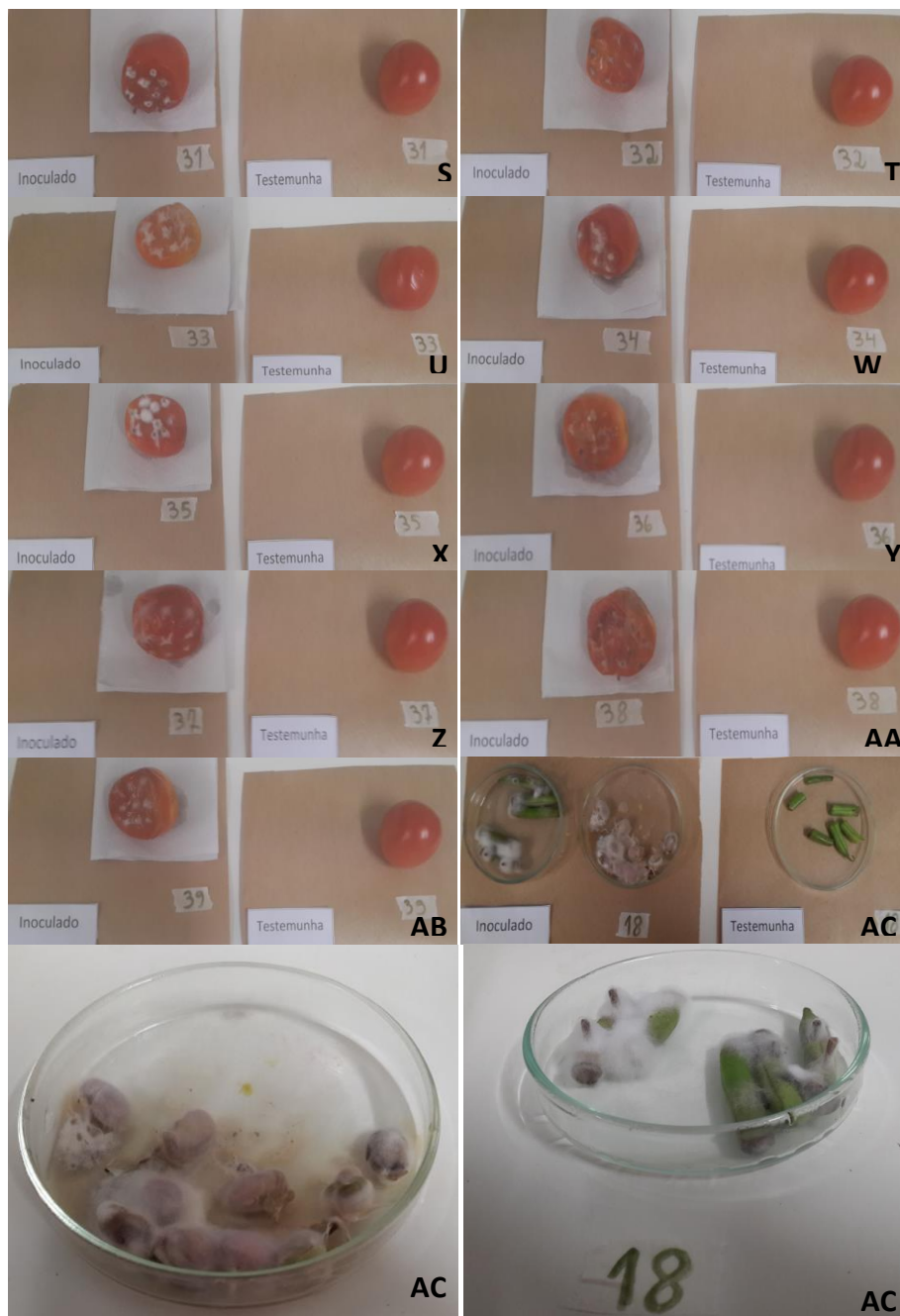


FIGURA 6. Sintomas e sinais dos fungos inoculados para o método terriço. Legendas: A (LAMIP 010), B (LAMIP 012), C (LAMIP 013), D (LAMIP 119), E (LAMIP 113), F (LAMIP 014), G (LAMIP 015), H (LAMIP 044), I (LAMIP 045), J (LAMIP 046), K (LAMIP 073), L (LAMIP 043), M (LAMIP 022), N (LAMIP 023), O (LAMIP 026), P (LAMIP 027), Q (LAMIP 029), R (LAMIP 030), S (LAMIP 031), T (LAMIP 032), U (LAMIP 033), W (LAMIP 034), X (LAMIP 035), Y (LAMIP 036), Z (LAMIP 037), AA (LAMIP 038), AB (LAMIP 039), AC (LAMIP 018). Fonte: BELOTI (2015).

4.1.2 Método óleo mineral

Quando preservados em óleo mineral, dos 31 isolados avaliados, apenas três permaneceram viáveis, identificados em meio de cultivo BDA: *Colletotrichum* spp. (11 anos e 84 dias), representado por LAMIP 120; *F. moniliforme* (oito anos e 168 dias), representado por LAMIP 161; e *Phomopsis* spp. (19 anos e 226 dias), representado por LAMIP 050 (Tabela 7) – todos permaneceram esporulantes em meio de cultivo BDA. Sintomas e sinais decorrentes das inoculações podem ser visualizados na Figura 7.

Tabela 7. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA pelo método óleo mineral. Uberlândia (MG). Fonte: BELOTI (2015)

Código	Patógeno	Esporulação	Colonização/ Patogenicidade	Sintomas/ Sinal	Tempo de Preservação
LAMIP 120	<i>Colletotrichum</i> spp.	+	Café	Micélio abundante e necrose	11 anos e 84 dias
LAMIP 161	<i>Fusarium moniliforme</i>	+	Tolete de cana	Podridão vermelha e crescimento micelial	8 anos e 168 dias
LAMIP 050	<i>Phomopsis</i> spp.	+	Jiló	Lesões concêntricas castanhas e presença de picnídios	19 anos e 226 dias

Inoculado para avaliação nos dias 22 e 24 de abril de 2014. (-) Não; (+) Sim.

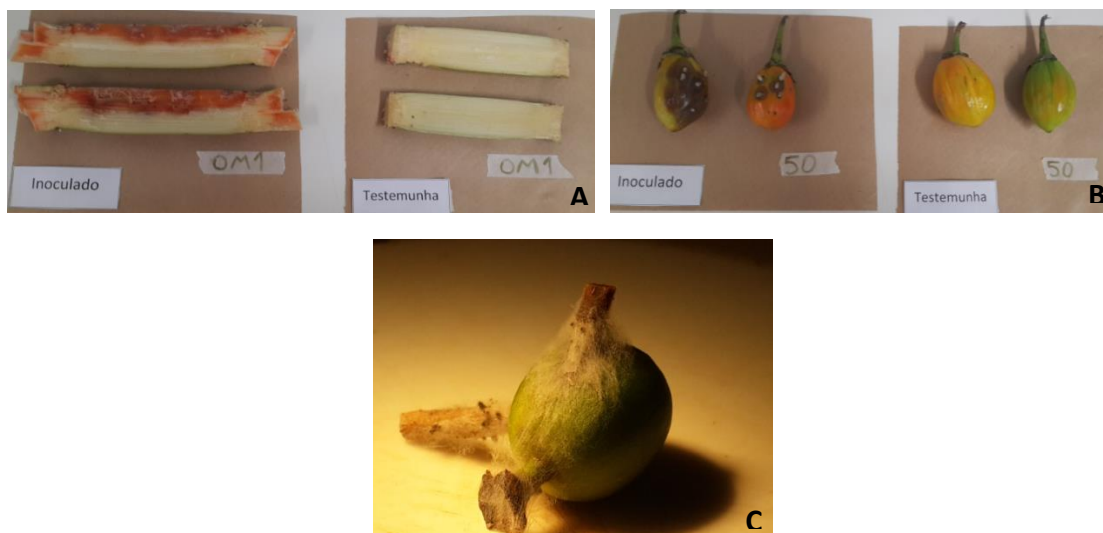


FIGURA 7. Sintomas e sinais dos fungos inoculados para o método óleo mineral. Legendas: A (LAMIP 161), B (LAMIP 050), C (LAMIP 120). Fonte: BELOTI (2015).

4.1.3 Método gelatina

No método gelatina, dos 17 isolados, 10 foram identificados como viáveis em meio de cultivo BDA: LAMIP 132 C, isolado de *Colletotrichum* spp. (16 anos e 40 dias); *Septoria* spp., com os isolados 133A (15 anos e 241 dias) e LAMIP 133B (15 anos e 62 dias); *Fusarium* spp. (até 16 anos e 40 dias): LAMIP 135, LAMIP 138 e LAMIP 140; *F. subglutinans* f. sp. ananas (cinco anos e 321 dias): LAMIP 167; *Macrophomina* spp. (cinco anos e 318 dias): LAMIP 169; *Phomopsis* spp. (seis anos e 11 dias): LAMIP 170 e *Verticillium* spp. (cinco anos e 318 dias): LAMIP 171. Todos permaneceram esporulantes, exceto os isolados de *Septoria* spp. (Tabela 8). Sintomas e sinais decorrentes das inoculações podem ser visualizados na Figura 8.

Tabela 8. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA pelo método gelatina. Uberlândia (MG). Fonte: BELOTI (2015)

Código	Patógeno	Esporulação	Colonização/ Patogenicidade	Sintomas/ Sinal	Tempo de Preservação
LAMIP 132C	<i>Colletotrichum</i> spp.	+	Maracujá	Podridão sem presença de acérvulo	16 anos e 40 dias
LAMIP 133A	<i>Septoria</i> spp.	-	Maracujá	Tecido necrosado	15 anos e 241 dias
LAMIP 133B	<i>Septoria</i> spp.	-	Maracujá	Tecido necrosado	15 anos e 62 dias
LAMIP 135	<i>Fusarium</i> spp.	+	Maracujá	Crescimento micelial	16 anos e 40 dias
LAMIP 138	<i>Fusarium</i> spp.	+	Gengibre	Podridão e crescimento micelial	11 anos e 354 dias
LAMIP 140	<i>Fusarium</i> spp.	+	Maça de algodão	Enegrecimento e crescimento micelial	9 anos e 296 dias
LAMIP 167	<i>Fusarium subglutinans</i> f. sp. Ananas	+	Abacaxi	Podridão interna e crescimento micelial	5 anos e 321 dias
LAMIP 169	<i>Macrophomina</i> spp.	+	Vagem de soja	Podridão da vagem	5anos e 318 dias
LAMIP 170	<i>Phomopsis</i> spp.	+	S.I.	S.I.	6 anos e 11 dias
LAMIP 171	<i>Verticillium</i> spp.	+	Tomate	Podridão superficial e crescimento micelial	5 anos e 318 dias

Inoculado para avaliação nos dias 14 e 17 de abril de 2014. (-) Não; (+) Sim; (S.I.) Sem informações.

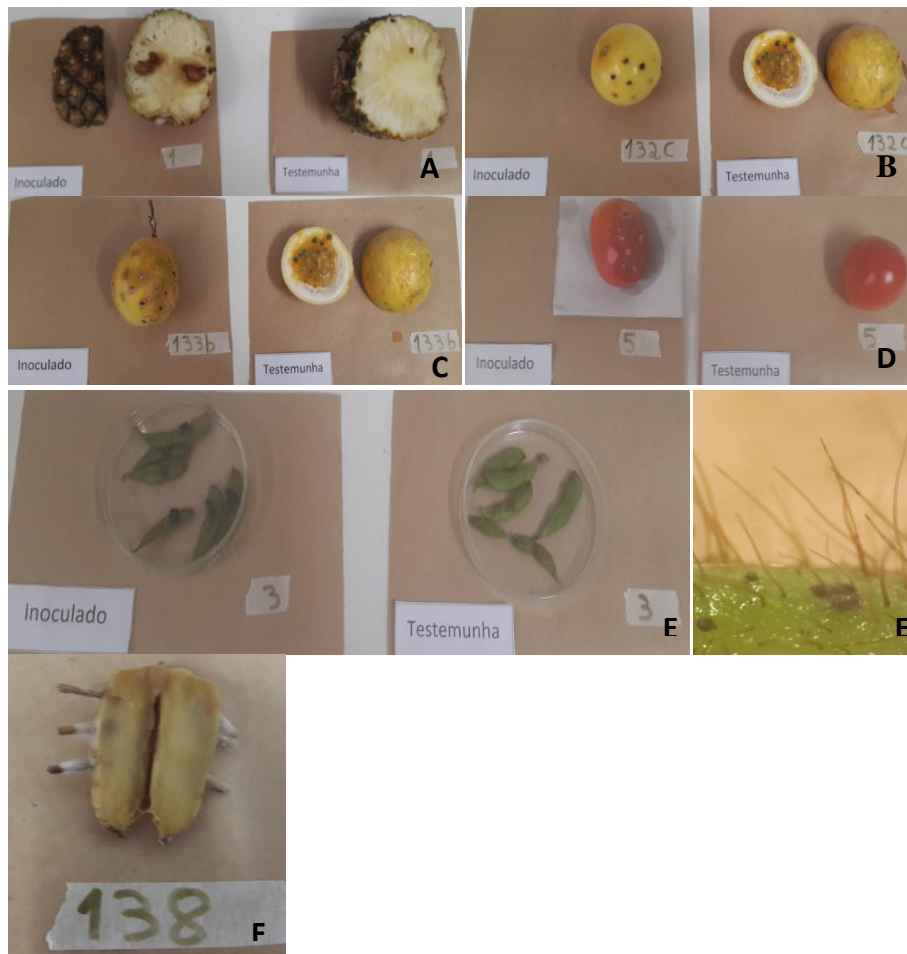


FIGURA 8. Sintomas e sinais dos fungos inoculados para o método gelatina. Legendas: A (LAMIP 167), B (LAMIP 132 C), C (LAMIP 133B), D (LAMIP 171), E (LAMIP 169), F (LAMIP 138). Fonte: BELOTI (2015).

4.1.4 Estruturas de resistência em 4 °C

Apenas LAMIP 175 permaneceu viável, com o menor tempo de preservação (cerca de quatro anos), formando micélio e estruturas de resistência em meio semisseletivo Neon-S modificado. Sintomas e sinais decorrentes da inoculação podem ser visualizados na Figura 9.

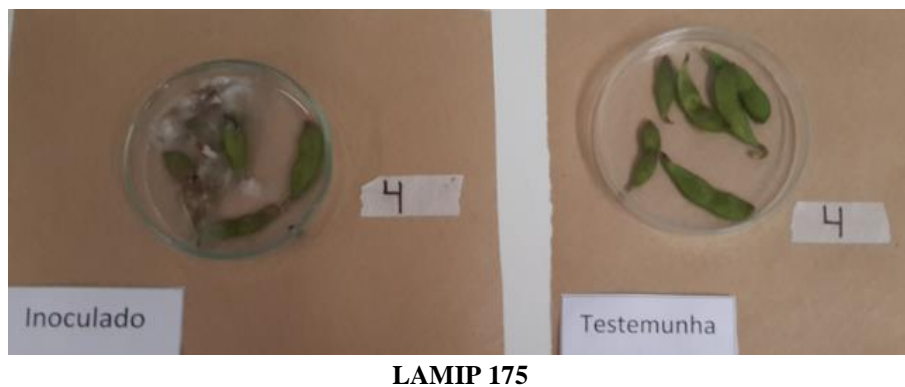


FIGURA 8. Sintomas e sinas da inoculação de *S. sclerotiorum* preservado em 4 °C.
Fonte: BELOTI (2015).

4.1.5 Método sílica-gel

Todos os isolados avaliados se mostraram viáveis em meio de cultivo BDA: *Septoria* spp. (três anos e 256 dias): LAMIF 001; *M. phaseolina* (três anos e 197 dias): LAMIF 011; *Cercospora* spp. (um ano e 69 dias): LAMIF 009 sem esporulação neste meio de cultivo; *A. sonchi* (um ano e 121 dias): LAMIF 002; *Bipolaris* spp. (quatro anos e 77 dias): LAMIF 006; *C. gloeosporioides* (três anos e 179 dias): LAMIF 012; *Curvularia* spp. (quatro anos e 77 dias): LAMIF 005; *P. lilacinum* (um ano e 131 dias): LAMIF 010; *Mycosphaerella* spp. (quatro anos e 77 dias): LAMIF 008, com perda na sua esporulação em meio BDA; *R. stolonifer* (três anos e 256 dias): LAMIF 003; *Pseudocercospora* spp. (três anos e 256 dias): LAMIF 014, sem esporulação em meio de cultivo BDA; *S. cepivorum* (um ano e 157 dias): LAMIF 004; *Trichoderma* spp. (um ano e 205 dias): LAMIF 013 e *S. sclerotiorum* (um ano e 205 dias): LAMIF 007 (Tabela 9). Sintomas e sinais decorrentes das inoculações podem ser visualizados na Figura 10.

TABELA 9. Fungos viáveis em meio de cultivo BDA pelo método sílica-gel. Monte Carmelo (MG). Fonte: BELOTI (2015)

Código	Patógeno	Esporulação	Colonização/ Patogenicidade	Sintomas/ Sinal	Tempo de Preservação
LAMIF 001	<i>Septoria</i> spp.	-	S.I.	S.I.	3 anos e 256 dias
LAMIF 002	<i>A. sonchi</i>	+	S.I.	S.I.	1 ano e 121 dias
LAMIF 003	<i>R. stolonifer</i>	+	S.I.	S.I.	3 anos e 256 dias
LAMIF 004	<i>S. cepivorum</i>	ER	Alho	Mofo cinzento	1 ano e 157 dias
LAMIF 005	<i>Curvularia</i> spp.	+	S.I.	S.I.	4 anos e 77 dias
LAMIF 006	<i>Bipolaris</i> spp.	+	S.I.	S.I.	4 anos e 77 dias
LAMIF 007	<i>S. sclerotiorum</i>	ER	Vagens de soja	Crescimento micelial	1 ano e 205 dias
LAMIF 008	<i>Mycosphaerella</i> spp.	-	S.I.	S.I.	4 anos e 77 dias
LAMIF 009	<i>Cercospora</i> spp.	-	S.I.	S.I.	1 ano e 69 dias
LAMIF 010	<i>P.lilacinum</i>	+	S.I.	S.I.	1 ano e 131 dias
LAMIF 011	<i>M. phaseolina</i>	+	Vagens e semente de soja	Enegrecimento de vagens e crescimento micelial	3 anos e 197 dias
LAMIF 012	<i>C. gloeosporioides</i>	+	S.I.	S.I.	3 anos e 179 dias
LAMIF 013	<i>Trichoderma</i> spp.	+	S.I.	S.I.	1 ano e 205 dias
LAMIF 014	<i>Pseudocercospora</i> spp.	-	S.I.	S.I.	3 anos e 256 dias

Inoculado para avaliação no dia 20 de outubro de 2014. (-) Não; (+) Sim. (ER) estruturas de resistência

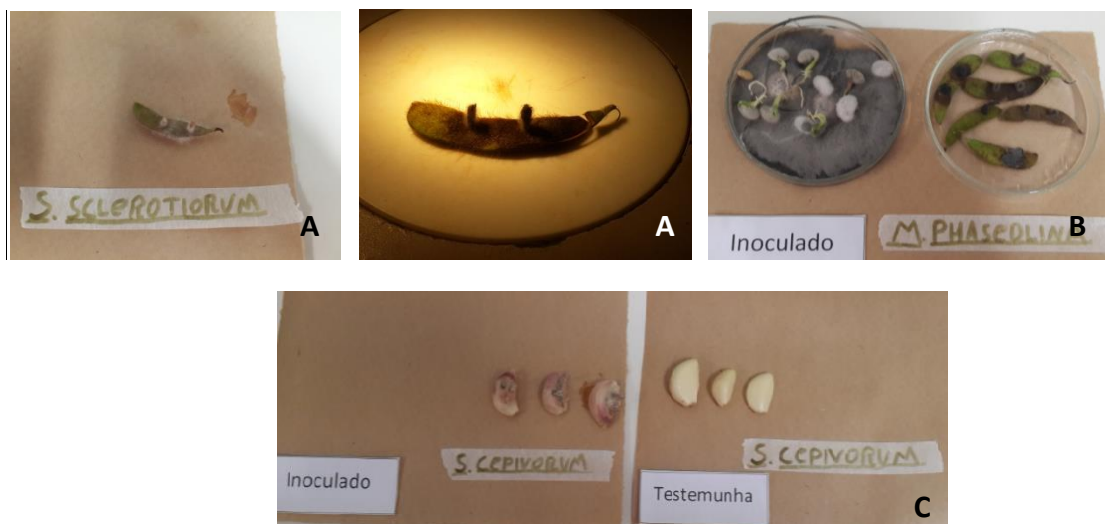


FIGURA 9. Sintomas e sinas dos fungos inoculados para o método sílica-gel. Legendas: A (LAMIF 007), B (LAMIF 011), C (LAMIF 004). Fonte: BELOTI (2015).

5 DISCUSSÃO

Para o gênero *Fusarium* sp., Windels (1992) não recomenda a preservação de culturas em solo esterilizado ou em meio de cultivo BDA. Entretanto, neste trabalho, isolados de até 25 anos e 186 dias (LAMIP 023) permaneceram viáveis e esporulantes, com ausência de contaminantes. Para espécies de *Fusarium* sp., o melhor método de preservação por longos períodos é a liofilização, empregada para preservar várias espécies de *Fusarium* sp. Desde 1978, o Fusarium Research Center, na Universidade do Estado da Pensilvânia, tem empregado essa técnica, sendo que das aproximadamente 16 mil culturas, todas permanecem viáveis (SINGLETON et al., 1992; WINDELS, 1992).

A preservação do gênero *Fusarium* sp. em nitrogênio líquido é recomendada por autores como Singleton et al. (1992); Windels (1992); e Dhingra; Sinclair (1995). Há relatos da preservação em sílica-gel, com manutenção da viabilidade de isolados após períodos de cinco anos em 5 °C (SINGLETON et al., 1992; DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Na micoteca do Commonwealth Mycological Institute (Reino Unido), *F. solani* permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos; 25 anos em óleo mineral; e 15 anos em -20 °C. Para a técnica alternativa de congelamento a seco, *F. graminearum* permaneceu viável após o período de 14 anos (SMITH, 1983; SMITH; ONIONS, 1983).

Na micoteca Mário Barreto Figueiredo, a viabilidade de culturas pertencentes às espécies *F. oxysporum* em cebola (*Allium cepa*) foi mantida por até 34 anos pelos métodos Castellani e de repicagens periódicas. Apenas o método Castellani manteve a patogenicidade, sendo eficiente na preservação das características morfofisiológicas (PASSADOR et al., 2010). Provavelmente, isso se deve à menor frequência com que as culturas são manuseadas, permanecendo o micélio em estado de latência, o que reduz a probabilidade de mutações que ocorrem nas repicagens periódicas (PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989).

F. oxysporum e *F. oxyporum* f. sp. *dianthi* foram preservados pelos métodos Castellani (um ano e dois meses; três anos e quatro meses, respectivamente) e *F. oxysporum* via liofilização (20 anos e 10 meses), mantendo-se viáveis, assim como *F. bulbigenum*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium* sp., que se mostraram viáveis após preservação de oito meses, pela técnica de congelamento de estruturas a -80 °C (APARECIDO et al., 2007; APARECIDO et al., 2012). Entretanto,

as melhores temperaturas para preservar clamidósporos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 (temperatura ambiente) durante um ano ocorreram em 5 °C e -20 °C (BUENO, 2004).

Como procedimento alternativo, cita-se o método de papel-filtro de Fong et al. (2000), que se mostrou muito eficaz para a preservação de *F. oxysporum* a -19 °C. Todos os isolados mantiveram-se viáveis após quatro anos de preservação, e todas as culturas recuperadas estavam isentas de infestação de ácaros. O método óleo mineral não é muito indicado para preservar o fungo de solo *Fusarium* sp. (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), o que corrobora com os resultados obtidos no trabalho, pois dos seis isolados preservados por esse método, apenas o isolado LAMIP 161 (*F. moniliforme*) preservado por oito anos e 168 dias permaneceu viável e esporulante. Dois isolados de *F. moniliforme* var. *subglutinans* foram preservados por repicagens periódicas (45 e 43 anos), Castellani (11 e 42 anos) e liofilização (ambos 23 anos) – todos se mantiveram viáveis e patogênicos em frutos de abacaxi (PIRES et al., 2012).

Para a espécie *S. rolfsii*, quando se comparou a preservação durante um ano de escleródios mantidos em três tratamentos (temperatura ambiente, 5 °C e -20 °C), a melhor temperatura foi a ambiente, mantendo-se a patogenicidade (BUENO, 2004). *Sclerotium* sp. permaneceu viável pela técnica de congelamento de estruturas a -80 °C após um período de sete meses (APARECIDO et al., 2012), e *S. rolfsii* foi preservado por períodos superiores a cinco anos utilizando óleo mineral (tubos de ensaio contendo meio de cultivo BDA), mantido a 25 °C (PUNJA; RAHE, 1992). Nesse sentido, perdas na patogenicidade de *S. coffeicola* em curto tempo pelo método repicagem periódica foram observadas por Menezes et al., (1997). A preservação de *S. rolfsii* em terriço se mostrou um bom método, com viabilidade após o período de 20 anos e 33 dias, superior ao encontrado na literatura.

Dados indicam que *Rhizoctonia* sp. permaneceu viável após um ano em tubos contendo meio de cultivo BDA e mantidos em temperatura ambiente (CARLING; SUMNER, 1992). Culturas desse patógeno não podem ser preservadas de 0 a 7 °C e -20 °C, e tal gênero pode ser preservado em laboratório em temperatura ambiente de seis a 12 meses em placas de Petri com meio de cultivo PDYA (batata-dextrose-levedura-água) ou BDA, em tecidos de plantas infectados ou em solo contendo 4% de farelo de trigo. Entretanto, Bueno (2004) relatou que os escleródios de *R. solani* mantidos em três

tratamentos (temperatura ambiente, 5 °C e -20 °C) morreram após cinco meses de avaliação, contradizendo a afirmação de Carling e Sumner (1992) quanto à preservação em temperatura ambiente. No método óleo mineral *R. solani*, pode ser preservado por até cinco anos; em terriço, por longos períodos de tempo (DHINGRA; SINCLAIR, 1995); e, em nitrogênio líquido, por cinco a seis anos (CARLING; SUMNER, 1992). *R. papayae* permaneceu viável após oito meses de preservação a -80 °C (APARECIDO et al., 2012), e *Rhizoctonia* spp., por até dois anos e nove meses pelo método Castellani (APARECIDO et al., 2007).

A preservação de escleródios de *R. solani* produzidos em substrato areno-orgânico não foi promissora, pois eles não permaneceram viáveis após cinco meses de avaliação (BUENO, 2004). O resultado encontrado neste trabalho não vai ao encontro desse fato, uma vez que isolados permaneceram viáveis em terriço por períodos de até 37 anos e 142 dias, superiores aos encontrados na literatura. A viabilidade desse gênero foi identificada apenas em meio de cultivo AA.

Para o gênero *Colletotrichum* spp., alguns autores relataram que ele permaneceu viável por até dez anos pelo método Castellani (FIGUEIREDO, 1967; SINGLETON et al., 1992; DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Dez isolados pertencentes ao gênero *Colletotrichum* foram preservados por períodos entre três e 34 anos, a partir dos métodos Castellani, de repicagens periódicas e -80 °C (apenas um isolado não permaneceu viável). Com relação à patogenicidade, duas amostras mantidas por Castellani e -80 °C e uma por repicagens periódicas não induziram a manifestação de sintomas. Assim, os fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* podem ser preservados em laboratório por qualquer um dos métodos referidos, uma vez que tanto a viabilidade quanto a patogenicidade foram mantidas. Outros isolados foram avaliados na técnica de congelamento de estruturas a -80 °C: *Colletotrichum* sp., *C. gossypii* e *C. gloeosporioides*, que permaneceram viáveis por um período de 18, sete e 18 meses, respectivamente (APARECIDO et al., 2012, APARECIDO; CAMILO, 2013).

Para *C. fragariae*, os métodos repicagem periódica (38 anos) e Castellani (36 anos) foram viáveis, porém apenas no método Castellani se manteve patogênico. Enquanto isso, para *C. gloeosporioides*, os métodos repicagem periódica (25 anos) e Castellani (23, 25 e 37 anos) mantiveram-se viáveis e patogênicos, exceto o isolado preservado por 37 anos, que não manteve sua patogenicidade. Já para *C.*

lindemuthianum, os métodos repicagem periódica (39 anos) e Castellani (12 anos) mantiveram-se viáveis (PIRES et al., 2012). *C. dematium* permaneceu viável em sílica-gel após dez anos, 21 anos em óleo mineral, quatro anos a -20 °C e sete anos em nitrogênio líquido, ao passo que *C. dematium* f. sp. *spinaciae* permaneceu viável em sílica-gel após dez anos, 11 anos em óleo mineral, 12 anos a -20 °C e dez anos em nitrogênio líquido. *C. gossypii* tornou-se inviável em sílica-gel após dois anos, mas viável, após cinco anos, em óleo mineral, 12 anos a -20 °C e 12 anos em nitrogênio líquido. *C. musae* permaneceu viável em sílica-gel após dez anos, dez anos em óleo mineral e 12 anos a -20 °C, e *C. tabacum* tornou-se inviável em sílica-gel após quatro anos, porém viável com dez anos em óleo mineral. *C. truncatum* tornou-se inviável em sílica-gel após um ano, porém viável com 21 anos em óleo mineral e cinco anos a -20 °C, e *C. typhae* permaneceu viável em sílica-gel após dez anos, dez anos em óleo mineral e dez anos a -20 °C (SMITH; ONIONS, 1983). Vale ressaltar que o fungo *Phomopsis* spp. se manteve viável após 14 anos, com o uso da técnica alternativa de congelamento a seco (SMITH, 1983).

Vinte e quatro isolados de *Septoria* spp. foram preservados em terrço e mantidos a 4 °C no escuro por 24 meses – *S. avenae*, *S. passerinii* e *S. tritici* – e 20 meses – *S. avenae* f. sp. *triticea*, *S. nodorum* –, que se mantiveram viáveis, sem perda na esporulação ou patogenicidade em *Triticum aestivum* após o período citado. Esse método minimizou variações nos isolados, como observado nas repicagens periódicas em meio nutriente ágar, sendo simples e confiável (SHEARER et al., 1973).

A preservação de *M. phaseolina*, em tecidos secos (colmos de milho e sorgo), foi constatada por um período de 16 a 18 meses, em que o fungo apresentou um grande número de escleródios viáveis após o período citado (COOK et al., 1973). Há relatos da preservação por congelamento por longos períodos, como o método de ultracongelamento (-70 °C) (MIHAIL, 1992; SINGLETON et al., 1992). Bueno (2004) relatou que a preservação em temperatura de -20 °C mostrou-se letal após dois meses de avaliação, inviabilizando a preservação na condição citada. A melhor temperatura para manter a viabilidade dos microescleródios, produzidos e armazenados na forma de substrato areno-orgânico, foi de 5 °C, pois eles mantiveram 100% de sobrevivência durante um ano e com maior vigor. A técnica de congelamento de estruturas a -80 °C utilizada pela micoteca Mário Barreto Figueiredo comprovou que isolados de *M. phaseolina* permaneceram viáveis e esporulantes após um mês de preservação

(APARECIDO et al., 2012), e, na micoteca do Commonwealth Mycological Institute, foi preservado em nitrogênio líquido por até seis meses (SMITH, 1983). Existem métodos alternativos para preservar esse fungo através de estruturas de resistência, com formação de microescleródios sobre palitos de madeira. Esses palitos são inseridos em placa de Petri estéril, selada e armazenada em temperatura ambiente, com preservação por até cinco anos (SINGLETON et al., 1992; MIHAIL, 1992).

Muitas espécies de *Verticillium* sp. podem ser preservadas à temperatura ambiente em tubos de ensaio, com o meio de cultivo BDA, por um ou dois anos (MELOUK, 1992). Finatti e Aparecido (2009) compararam os métodos de preservação repicagens periódicas, Castellani, liofilização e óleo mineral para *Verticillium* spp. Para os testes de viabilidade, as culturas foram transferidas para meio de cultivo BDA e AA, sendo que, a partir do crescimento, realizaram-se inoculações experimentais em solo com o hospedeiro original, para constatar a manutenção da patogenicidade. Com os resultados concluiu-se que, para o gênero *Verticillium*, o método Castellani seria o mais eficiente, pois, além de as plantas inoculadas apresentarem sintomas mais rapidamente, os isolados demonstraram maior agressividade. Segundo esses autores, espécies pertencentes a tal gênero, por apresentarem esporos extremamente delicados, são incapazes de resistirem ao processo de liofilização. Nessa instituição, as espécies *V. fungicola*, preservada unicamente pelo método Castellani (15 anos); e *V. dahliae*, pelos métodos de Castellani e repicagens periódicas (seis anos), permaneceram viáveis e patogênicas (PASSADOR et al., 2010). *V. dahliae*, preservado pelos métodos Castellani, permaneceu viável por até 12 anos e 11 meses; e *V. albo-atrum*, por 12 anos (APARECIDO et al., 2007). Para o método de congelamento de estruturas a -80 °C, *V. dahliae* e *V. albo-atrum* permaneceram viáveis por 18 meses, e *V. fungicola*, por 19 meses (APARECIDO et al., 2012).

V. fungicola manteve-se viável e patogênico pelo método Castellani por 13 anos, enquanto *V. dahliae* se manteve viável pelo método repicagem periódica por até 44 anos, sem manutenção da patogenicidade, e até 39 anos, com manutenção da patogenicidade; pelo método Castellani, se manteve por até 11 anos (viável e patogênico). Para *V. albo-atrum*, a viabilidade e patogenicidade foram mantidas por períodos de até 31 anos (repicagens periódicas) e 11 anos (Castellani) (PIRES et al., 2012). *Verticillium dahliae* permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos, 22 anos em óleo mineral e oito anos a -20 °C (SMITH; ONIONS, 1983). Nesse sentido, *V. dahliae*

pode ser preservado por cinco anos ou mais em uma mistura de solo autoclavado (solo, perlita e turfa), quando mantido em temperatura de 5 °C (MELOUK, 1992; SINGLETON et al., 1992).

Bueno (2004) constatou que a melhor temperatura para manter a viabilidade dos microescleródios, produzidos e armazenados até um ano na forma de substrato areno-orgânico, foi de -20 °C, uma vez que todos sobreviveram apresentando maior vigor em relação às demais temperaturas avaliadas. Alternativamente, o gênero *Verticillium* sp. pode ser preservado a partir de microescleródios formados em colônias do fungo, desenvolvidas em meio de cultivo BDA por 15 dias e desidratadas em sulfato de cálcio por 72 horas, de 22 a 25 °C. O pó contendo as estruturas de resistência do fungo é inserido em envelopes e, em seguida, armazenado em ambiente seco. Nessa condição, notou-se preservação por dois anos (SINGLETON et al., 1992; MIHAIL, 1992).

Os escleródios de *S. sclerotiorum*, após serem removidos de plantas doentes ou meio de cultivo, podem ser preservados a temperaturas de 2 a 5 °C (SINGLETON et al., 1992; PRATT, 1992). Bueno (2004) notou que, após nove meses de avaliação, houve diminuição gradativa na sobrevivência do fungo na temperatura de geladeira (5 °C). Esse autor desenvolveu uma metodologia para preservação de estruturas de resistência para *S. sclerotiorum* em temperatura de -20 °C, armazenando tais estruturas em frascos de 500 mL. Após um ano de preservação, todos mantiveram a patogenicidade na metodologia desenvolvida, e o isolado LAMIP 175 manteve-se viável na temperatura de 5 °C, sugerindo que esse tipo de preservação não poderá exceder a quatro anos, como proposto por Singleton et al. (1992) e Pratt (1992). Tal fungo também pode ser preservado por repicagens periódicas por um curto período de tempo (SINGLETON et al., 1992); em contrapartida, Pratt (1992) relata que este pode ser preservado pelo método de repicagens por longos períodos na forma de escleródios, ascósporos e micélio.

Nesses termos, *Alternaria citri*, preservado pelo método Castellani, manteve-se viável após 12 anos (APARECIDO et al., 2007). *A. solani*, preservado a partir dos métodos repicagens periódicas (45 anos), Castellani (12 anos) e liofilização (20 anos), permaneceu viável, mas perdeu sua patogenicidade (PIRES et al., 2012). *A. tenuis* e *A. brassicicola*, preservados a -80 °C, permaneceram viáveis após sete meses (APARECIDO et al., 2012), e *A. alternata* permaneceu viável por 11 anos em sílica-gel,

20 anos em óleo mineral e 15 anos a -20 °C. *A. brassicae* permaneceu viável por dez anos em sílica-gel, oito anos em óleo mineral e 11 anos a -20 °C, ao passo que *A. chlamydosporum* permaneceu viável por dez anos em sílica-gel, 11 anos em óleo mineral e dez anos a -20 °C (SMITH; ONIONS, 1983). Nesse caso, *Bipolaris oryzae*, preservado pelo método Castellani, permaneceu viável após 12 anos e três meses (APARECIDO et al., 2007).

Na micoteca do Commonwealth Mycological Institute, Smith (1983) avaliou a técnica de preservação em nitrogênio líquido, realizada em duas etapas: diminuição da temperatura da amostra em uma taxa de 1 °C por minuto até atingir -35 °C; e inserção desta em nitrogênio líquido (-196 °C) antes da selagem a vácuo. *Cercospora xanthosomatis* manteve-se viável e esporulante após seis meses; e cinco isolados de *C. coffeicola*, preservados em papel-filtro esterilizado e na forma de discos de micélio em meio de cultivo, ambos preservados em microtubos do tipo Eppendorf em temperatura ambiente, mantiveram-se viáveis e esporulantes após seis meses, quando plaqueados em meio V8 (BOTELHO et al., 2013). Isso sugere que, para o gênero citado, o meio V8 é mais adequado para a reativação do crescimento e esporulação, posto que, para o isolado LAMIF 009, não ocorre esporulação em meio de cultivo BDA. Sete isolados de *C. coffeicola* foram preservados pelos métodos Castellani, em frascos tipo Eppendorff, nas temperaturas ambientes, -18 °C, -80 °C, -100 °C e liofilização. Todos permaneceram viáveis após seis meses em todos os métodos testados, com exceção daqueles mantidos em -18 °C, que perderam a viabilidade após três meses (DELL'ACQUA et al., 2009).

Preservado pelo método Castellani, *Curvularia lunata* manteve-se viável após 37 anos e seis meses (APARECIDO, 2007), enquanto *Curvularia lunata* var. *aeria* permaneceu viável em sílica-gel após dez anos, 13 anos em óleo mineral, 11 anos a -20 °C e 11 anos em nitrogênio líquido (SMITH; ONIONS, 1983). Smith (1983) avaliou a técnica alternativa de congelamento a seco, com o auxílio de centrifugação de discos de ágar sem meio de suspensão, utilizada na micoteca do Commonwealth Mycological Institute para *Curvularia trifolii* f. sp. *gladioli*, que permaneceu viável após 13 anos.

Penicillium italicum manteve-se viável com amostras preservadas por repicagens periódicas (45 anos), Castellani (12 anos) e liofilização (22 anos). Entretanto, apenas aquela proveniente da liofilização se manteve patogênica (PIRES et al., 2012). *P.*

baarnense permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos, 25 anos em óleo mineral, 14 anos a -20 °C e 12 anos em nitrogênio líquido; *P. brefeldianum* permaneceu viável em sílica-gel após dez anos, 11 anos em óleo mineral, três anos a -20 °C e dez anos em nitrogênio líquido; *P. chrysogenum* permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos, 25 anos em óleo mineral e quatro anos a -20 °C; *P. claviforme* permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos, 25 anos em óleo mineral, 15 anos a -20 °C; *P. corylophilum* tornou-se inviável em apenas dois anos em sílica-gel, permanecendo viável após 19 anos em óleo mineral e 11 anos a -20 °C; *P. lavendulum* tornou-se inviável em apenas um ano em sílica-gel, permanecendo viável após 27 anos em óleo mineral e 15 anos a -20 °C; *P. luteum* permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos, 20 anos em óleo mineral, dez anos a -20 °C e dez anos em nitrogênio líquido; *P. notatum* permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos, 24 anos em óleo mineral, seis anos a -20 °C e 11 anos em nitrogênio líquido; e *P. wortmannii* permaneceu viável em sílica-gel após dez anos, 15 anos em óleo mineral, dez anos a -20 °C e dez anos em nitrogênio líquido (SMITH; ONIONS, 1983). Smith (1983) avaliou a técnica alternativa de congelamento a seco, constatando que várias espécies do gênero permaneceram viáveis por 13 anos (*P. raperi*) e 14 anos (*P. cyclopium* var. *echinulatum*, *P. nigricans*, *P. paraherquei*, *P. raperi*, *P. roquefortii*, *P. spinuloramigenum* e *P. steckii*). Além disso, *Rhizopus homothallicus* permaneceu viável em sílica-gel após 11 anos, 20 anos em óleo mineral, 11 anos a -20 °C e dez anos em nitrogênio líquido (SMITH; ONIONS, 1983).

No centro de pesquisas da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), no Brasil, avaliou-se a viabilidade da massa esporógena de *Trichoderma stromaticum* preservada em fragmentos de vassouras secas de cacaueiros, mantidas a 5 °C; e a atividade antagônica (parasitária) em vassouras secas de cacaueiro (*Theobroma cacao*). Todos os isolados apresentaram-se viáveis após quatro anos, com crescimento e esporulação normais e antagônicos a *Crinipellis pernicioso* (BASTOS, 2008).

T. viride (proveniente do solo de uma área produtora de cacau), preservado pelo método Castellani, manteve-se viável após dez anos (APARECIDO et al., 2007). Na micoteca do Commonwealth Mycological Institute, *T. viride* tornou-se inviável em sílica-gel após cinco anos, permanecendo viável após 25 anos em óleo mineral e quatro anos a -20 °C (SMITH; ONIONS, 1983). No Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), em Cuba, a preservação de *T. harzianum* Rifai foi avaliada para os métodos sílica-gel, Castellani e óleo mineral. A viabilidade, os caracteres morfológicos

e a capacidade antagonista foram avaliados durante um ano. Nesse caso, as amostras mantidas por Castellani e óleo mineral não apresentaram diferenças em relação à cultura inicial preservada em meio de cultivo BDA a 4 °C, enquanto as que estavam em sílica-gel permaneceram viáveis durante apenas três meses (BATISTA; CÁRDENAS, 2010). Neste trabalho, *Trichoderma* spp. (LAMIF 013) permaneceu viável após um ano e 205 dias em sílica-gel, e, para os gêneros *Pseudocercospora* spp. e *Mycosphaerella* spp., não foi reportado nenhum dado de preservação na literatura.

Uma hipótese para a baixa eficácia do método óleo mineral no LAMIP concerne à grande quantidade de óleo inserida nos tubos no processo de preservação, que excedeu 2 cm em relação ao meio, acarretando redução da viabilidade em condições de total exaustão de oxigênio, como referido por Romeiro (2006). O óleo utilizado (vaselina) não é indicado por alguns autores, como Alfenas e Mafia (2007), que preconizam o uso do Nujol.

6 CONCLUSÕES

- 1 - O método terriço foi adequado para a preservação, a longo prazo, dos gêneros e espécies *Fusarium spp*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia spp*.
- 2 - O método óleo mineral mostrou-se adequado para fungos pertencentes aos gêneros e espécies *Colletotrichum spp.*, *F. moniliforme* e *Phomopsis spp*.
- 3 - O método gelatina foi adequado para a preservação, em longo prazo, dos gêneros e espécies *Colletotrichum spp.*, *Septoria spp.*, *Fusarium spp.*, *F. subglutinans* f. sp. ananas, *Macrophomina spp.*, *Phomopsis spp.* e *Verticillium spp*.
- 4 - O tempo máximo para preservação de escleródios de *S. sclerotiorum* a 4 °C foi de aproximadamente quatro anos.
- 5 - O método sílica-gel foi adequado para a preservação em médio prazo, sendo que todos os isolados avaliados permaneceram viáveis.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microorganismos do UniCEUB**. Brasília, Universitas Ciências da Saúde, v.02 n.2, p. 236-25, 2003.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV. 382 p. 2007.

ANJOS, T. V.; TEBALDI, N. D. FAGIAN, C. C.; Coleção preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. **Horizonte científico**, Uberlândia, n. 1, p. 1-24, ago, 2012.

APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a manutenção da viabilidade e patogenicidade de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, agente causal da gomose em fruto de abacaxi, preservado por três diferentes métodos. **Revista do Núcleo de Pesquisas da Faculdade de Ciências Exatas e Experimentais da Universidade Mackenzie**, São Paulo, v.1, p.148-151, 1997.

APARECIDO, C.C.; HUANG; C.T.M.; PASSADOR, M.M.; FINATTI, D.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de castellani (água destilada) e liofilização. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.1, p.5-8, jan./jun., 2007.

APARECIDO, C. C.; PIRES, G.C.C ; FINATTI, D., CAMILO, C. de M. Preservação de micro-organismos a -80° C. **Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.23-29, jan./jun., 2012.

APARECIDO, C.C.; CAMILO, C.M. Comparação de métodos para a preservação de fungos do gênero *colletotrichum* em laboratório. **Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.17-22, jan./jun., 2013.

APARECIDO, C.C.; CAMILO, VAZ LOBO; R.S.; Preservação de *Pythium* e *Phytophthora* a -80° C. **Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.5-10, jan./jun., 2013.

AUTREY, L.J.C.; MOUTIA, Y.; SAUMTALLY, S. Screening of seedlings against rust, inoculation treatment and assessment by video image analysis. **Sugar Cane**, Port Talbot, v.1, p.4-10, 1996.

BAATI, L; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing on the viability and cellular protein levels. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 241-247, sep. 2000.

BARKER, K. **Na bancada. Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 474 p.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**, 4 ed. APS Press, St. Paul Minnesota, USA, 1998. 218 p.

BASTOS, C. N. Método para preservação da viabilidade e atividade antagônica de *Trichoderma stromaticum*, agente de biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauieiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.3, p.265-266, 2008.

BATISTA, D. R.; CÁRDENAS, Y. G. Métodos alternativos en la conservación de *trichoderma harzianum* rifai. **Fitosanidad**, Havana, vol. 14, n. 4, p. 241-246, dez, 2010.

BOTELHO, D. M. S.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; PATRÍCIO, F. R. A.; PEREIRA, E. A.; CARVALHO, C.A.; MARTINS, S. A., SILVA JÚNIOR, M. B. Avaliação de dois métodos de preservação de *cercospora coffeicola*. In: VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2013, Salvador - BA. **Anais do VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Disponível em: <<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/consorcio/separador2/simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil/549-anais-do-viii-simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil>>. Acesso em: 05 fev. 2015.

BUENO, C. J.; **Produção e preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo**. 2004. xiii, 101 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2004.

CANHOS, V.P. Views of a developing country. In: KIRSOP, B., HAWKSWORTH, D.L. (Eds.). **The biodiversity of microorganisms and the role of microbial resource centers**. World Federation for Culture Collections, 1994. p. 45-52.

CANHOS, V. P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 55, n. 3, p. 27-29, 2003.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos**. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.

CARLING, D. E.; SUMNER, D. R. Rhizoctonia. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p.157-165.

CARVALHO, F. D. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.

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

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

COOK, G. E.; BOOSALIS, M.G.; DUNKLE, L.D.; ODVODY, G.N. Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum stalk residue. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 57, p. 873-875, 1973.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, 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.

DELL'ACQUA, R.; PATRÍCIO, F.R.A.; MANTOVANI, E.S. Avaliação de métodos de preservação de isolados de *Cercospora coffeicola*. **Biológico**, São Paulo, v.71, suplemento, p.17-41, 2009.

DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. 2014. 29 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado interdisciplinar em biosistemas). Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2014.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

FERRAZ, L. C. L. **Práticas culturais para o manejo de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro**. 2001. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **Biológico**, São Paulo, v.33, p.9-13, 1967.

FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, P.V.C. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.1, p.299-302, 1975.

FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, P.V.C. Primeiro catálogo da Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica, Instituto Biológico de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.44, n.4, p.247-256, 1977.

FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL P.V.C.; PITTA, G.B.P. Preservação da patogenicidade de alguns fungos conservados em água destilada. **Biológico**, São Paulo, v.46, p.279-308, 1980.

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.

FONG, Y. K.; ANUAR, S.; LIM, H.P.; THAM, F.Y.; SANDERSON, F.R. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. **Mycologist**, London, v. 4, p. 127–130, 2000.

FURTADO, G. Q.; ALVES, S.A. M.; CZERMAINSKI, A. B. C.; MASSOLA JR, N. S.; Preservation of *Phakopsora pachyrhizi* Uredospores, **Journal of Phytopathology**, Bari, n.156, p.62–64, 2008.

GERHARDT, P.E. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 791 p.

GIRÃO, M. D.; DO PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO R. A.; MONTEIRO A. J.; 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**, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, maio-junho, 2004.

GREEN, L. H. **Practical handbook of microbiology**. CRC: London, 2 ed. 2008.

HAWKSWORTH, D. L., KIRK, P. M., Sutton, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8th Edition. International Mycological Institute, CAB International, UK, 1995.

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.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.

IMBABY, I. A.; NAZARIM, M.; ALI, M. M.; NAGWA, I. A.; Viability of Wheat Rust Urediniospores Produced on Different Stages of Susceptible Plants, **Egyptian Journal Phytopathology**, Orman, v 33, n.1, p.59-76, 2005.

LEAL-BERTOLI, S.C.M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, p.197-230, 1998.

MELOUK, H. A. Verticillium. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 175-178.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. V. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife, UFRPE, Imprensa Universitária, 1997. 106 p.

MERYMAN, H. T. **Cryobiology**. London and New York : Academic Press. 1966

MIHAIL, J. D. Macrophomina. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 134-136.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, ago. 2006.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 8 ed., ASM Press, Washington DC, 2003. 2113 p.

NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 167-169, 2008.

O'BRIEN, R.G; WEINERT, M. A storage technique for cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*). **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 23, pg. 86-87, 1994.

OLIVEIRA, V.M., SETTE, L.D., FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos**. Divisão de Recursos Microbianos. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p.1-19, 2006.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais 87p. 2007.

PAOLI, P. Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstico e pesquisa. **FEMS Microbiol Reviews**, Amsterdam, v. 29, pg. 897-910, 2005.

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, jan./jun., 2010.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Séries em Biotecnologia. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, p. 62, v. 1, 2008.

PÉREZ-GARCÍA, A.; MINGORANCE, E.; RIVERA, M. E. ; DEL PINO, D.; ROMERO, D.; TORES, J. A.; DE VICENTE, A. Long-term Preservation of *Podosphaera fusca* Using Silica Gel. **Journal Phytopathology**, Bari, v.154, p.190-192, 2006.

PIRES, G.C.C.; APARECIDO, C.C.; FINATTI, D. preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. **Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.9-16, jan./jun., 2012.

PIMENTEL, C.P.V.; FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **Biológico**, São Paulo, v.55, n.1/2, p.27-33, 1989.

PITOMBO, R.N.M. A liofilização como técnica de preservação de material de pesquisa. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.41, p.427-431, 1989.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 666, 1949.

PRATT, R. G. Sclerotinia. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, p. 74-78, 1992.

PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. Sclerotium. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, p. 166-170, 1992.

QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, Artmed, p.512, 2005.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

ROSS, D. O. **Virgil Elements: Physics and Poetry in the Georgics**. Princeton University Press, p. 159, 1987.

SANTOS, R. R.; **Deteção de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio neon-s modificado em sementes de soja e feijão**. 37 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de ciências agrárias, 2014.

SHEARER, B. L.; ZEYEN, R. J.; OOKA, J. J. Storage and behavior in soil of septoria species isolated from cereals. *Phytopathology* 64:163-167. 1973.

SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 265p, 1992.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. A comparison of some preservation techniques for fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.81 , n.3, p.535-540, 1983.

SMITH, D. A two stage centrifugal freeze drying method for the preservation of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 80, n.2, p. 333-337, 1983.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The Preservation and Maintenance of Living Fungi**. IMI Technical Handbook No.2. International Mycological Institute, CABInternational, UK, 1994.

SMITH, D. The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi. **Cryo-Letters**, v. 19, p.79-90, 1998.

SMITH, D.; RYAN, M.J. **Situação atual das coleções de fungos e seu papel na biotecnologia**. Handbook of fungal biotechnology, Marcel Dekker, New York, p. 527-538, 2003.

SOLA, M. C.; DE OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; MINAFRA e REZENDE, C. S. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1398- 1418, 2012.

SPUTTEKA, A.; ROWEB, A. W. Looking Back from the Future to the Present: Biopreservation Will Get Us There! **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Freiburg, v. 38, p. 85–87, 2011.

TAKATSU, A. **Preservação de bactérias fitopatogênicas pelo método de dessecação**. Universidade de Brasília. Departamento de Biologia Vegetal. 1985, 5 p. Mimeografado.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 964, 2011.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; CUNHA, M. G.; Avaliação de métodos para preservação de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei1 **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, p. 296-298, abr./jun. 2011.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis, Burgess Publish Co., 1969.

VYSEKANTSEV, I. P.; GURINA, T. M.; MARTSENYUK, V. F.; PETRENKO, T. F.; KUDOKOTSEVA, E. V.; KOSHCHIY, S. V.; GROSHEVOY, M. I. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. **Cryo Letters**, London, v. 26, n. 6, p. 401- 408, 2005.

WATSON, P. F. As causas da redução da fertilidade com sêmen criopreservado. **Animal Reproduction Science**, London, v.60/61, p.481-492, 2000.

WINDELS, C. E. Fusarium. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p. 115-128.

WOLFE, J.; BRYANT, G. **Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects**. International Journal of Refrigeration, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.

ANEXO

ANEXO. Métodos e tempo de preservação para fungos de interesse fitopatológico encontrados na literatura.

Patógeno	Hospedeiro	Método de preservação	Manutenção da patogenicidade	Tempo de preservação	Referências
<i>Actinomyces scabei</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (batata)	Liofilização	*S.I.	20 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Alternaria</i> spp.	Rainha margarida (haste e folhas)	Castellani	S.I.	10 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>A. brassicicola</i>	S.I.	-80°C	S.I.	7 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>A. citri</i>	Tangerina	Castellani	S.I.	12 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>A. solani</i>	Batata	Repicagens periódicas	-	45 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. solani</i>	Batata	Castellani	-	12 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. solani</i>	Batata	Liofilização	-	20 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. tenuis</i>	S.I.	-80°C	S.I.	7 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Ascochyta</i> spp.	Couve-flor	Castellani	S.I.	11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>A. phaseolorum</i>	Berinjela (planta híbrida)	Castellani	S.I.	11 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Aspergillus albus-candidus</i>	S.I.	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. candidus</i>	<i>Citrus</i> sp. (laranja)	Liofilização	S.I.	21 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>A. flavipes</i>	Fungo entomógeno	Liofilização	S.I.	21 anos e 9 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>A. flavus</i>	<i>Citrus</i> sp. (laranja)	Liofilização	S.I.	21 anos e 10 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>A. flavus</i>	S.I.	Liofilização	S.I.	22 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>A. flavus</i>	S.I.	Liofilização	+	23 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. flavus</i>	Milho	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>A. flavus</i>	S.I.	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. fumigatus</i>	S.I.	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. niger</i>	Cebola	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. niger</i>	S.I.	Repicagens periódicas	+	28 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. virescens</i>	S.I.	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)
<i>A. wentii</i>	S.I.	Liofilização	S.I.	21 anos e 3 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>A. wentii</i>	Tomate	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)
<i>Bipolaris orizae</i>	Arroz (folhas)	Castellani	S.I.	12 anos e 3 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Botrytis</i> spp.	Gérbera	Castellani	S.I.	8 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>B. cinérea</i>	Gérbera (flores)	Repicagens periódicas	+	8 anos	Pires et al. (2012)
<i>B. cinérea</i>	Gérbera (flores)	Castellani	+	8 anos	Pires et al. (2012)
<i>B. cinerea</i>	S.I.	-80°C	S.I.	6 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Botrytis</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	18 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Ceratocystis</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	5 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>C. fimbriata</i>	Mangueira (mudas)	Castellani	S.I.	11 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>C. fimbriata</i>	Hypocryplalus	Castellani	S.I.	4 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>C. fimbriata</i>	<i>Populus</i> sp.	Liofilização	S.I.	19 anos e 10 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>C. fimbriata</i>	S.I.	Liofilização	S.I.	19 anos e 10 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>C. fimbriata</i>	S.I.	-80°C	S.I.	18 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>C. paradoxa</i>	Coco anão	Repicagens periódicas	+	38 anos	Pires et al. (2012)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>C. paradoxa</i>	Coco anão	Castellani	+	3 anos	Pires et al. (2012)
<i>Cladosporium</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	5 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Colletotrichum fragariae</i>	Morango (frutos)	Repicagens periódicas	-	38 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. fragariae</i>	Morango (frutos)	Castellani	+	36 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. gloeosporioides</i>	Jiló	Repicagens periódicas	+	30 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. gloeosporioides</i>	Jiló	Castellani	+	30 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. gloeosporioides</i>	Jiló	-80°C	+	30 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. gloeosporioides</i>	Maracujá	Repicagens periódicas	-	14 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. gloeosporioides</i>	Maracujá	Castellani	+	14 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. gloeosporioides</i>	Maracujá	-80°C	+	14 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. gloeosporioides</i>	Jiló	Repicagens periódicas	+	25 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. gloeosporioides</i>	Jiló	Castellani	+	25 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. gloeosporioides</i>	Pimentão	Repicagens periódicas	+	23 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. gloeosporioides</i>	Berinjela	Repicagens periódicas	-	37 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. gloeosporioides</i>	S.I.	-80°C	S.I.	18 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>C. gossypii</i>	S.I.	-80°C	S.I.	7 meses	Aparecido et al. (2012)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>C. lindemuthianum</i>	Vagem	Repicagens periódicas	+	39 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. lindemuthianum</i>	Vagem	Castellani	+	12 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. lindemuthianum</i>	Vagem	Repicagens periódicas	+	3 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. lindemuthianum</i>	Vagem	Castellani	+	3 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>C. lindemuthianum</i>	Vagem	-80°C	+	3 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	Repicagens periódicas	+	34 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	Castellani	+	34 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	-80°C	+	34 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	Repicagens periódicas	+	31 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	Castellani	+	31 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	-80°C	+	31 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Manga	Repicagens periódicas	+	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Manga	-80°C	+	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	Castellani	-	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Laranja	-80°C	-	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Mamão	Repicagens periódicas	-	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Mamão	-80°C	+	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>Colletotrichum</i> spp.	Goiaba	Castellani	+	4 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Goiaba	-80°C	+	4 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Citrus sinensis</i>	Castellani	S.I.	22 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>Colletotrichum</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	18 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Colletotrichum</i> spp..	Manga	Castellani	+	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp..	Laranja	Repicagens periódicas	+	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Colletotrichum</i> spp..	Mamão	Castellani	+	5 anos	Aparecido e Camilo (2013)
<i>Corynespora cassiicola</i>	S.I.	Castellani	+	6 meses	Teramoto et al. (2011)
<i>C. cassiicola</i>	S.I.	Óleo mineral	+	6 meses	Teramoto et al. (2011)
<i>C. cassiicola</i>	S.I.	Repicagens periódicas	+	6 meses	Teramoto et al. (2011)
<i>Curvularia lunata</i>	Arroz (folhas)	Castellani	S.I.	37 anos e 6 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Cylindrocladium citri</i>	S.I.	Castellani	S.I.	11 anos e 10 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>C.clavatum</i>	Eucalipto	Repicagens periódicas	+	25 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. ilicicola</i>	Eucalipto	Repicagens periódicas	+	42 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. ilicicola</i>	Eucalipto	Castellani	+	9 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. iliciola</i>	Eucalipto	Castellani	S.I.	5 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>C. scoparium</i>	Eucalipto	Castellani	S.I.	10 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>C. scoparium</i>	Eucalipto	Repicagens periódicas	+	43 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. scoparium</i>	Eucalipto	Castellani	+	9 anos	Pires et al. (2012)
<i>C. scoparium</i>	Eucalipto	Repicagens periódicas	+	40 anos	Pires et al. (2012)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>C. scoparium</i>	S.I.	-80°C	S.I.	5 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Cylindrocladium</i> spp.	Eucalipto (folhas)	Castellani	S.I.	2 anos e 3 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Cylindrocladium</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	14 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>C. Clavatum</i>	Eucalipto	Castellani	+	9 anos	Pires et al. (2012)
<i>Erysiphe graminis</i>	S.I.	Tecidos secos do hospedeiro (10°C)	S.I.	12 anos	Menezes e Silva-Hanlin (1997)
<i>Fusarium bulbigenum</i>	S.I.	-80°C	S.I.	8 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	Abacaxi (frutos)	Repicagens periódicas	+	43 anos	Pires et al. (2012)
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	Abacaxi (frutos)	Castellani	+	42 anos	Pires et al. (2012)
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	Abacaxi (frutos)	Liofilização	+	23 anos	Pires et al. (2012)
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	Abacaxi (frutos)	Repicagens periódicas	+	45 anos	Pires et al. (2012)
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	Abacaxi (frutos)	Liofilização	+	23 anos	Pires et al. (2012)
<i>F. oxysporum</i>	Cebola (<i>Allium cepa</i>)	Repicagens periódicas	-	34 anos	Passador et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i>	Cebola (<i>Allium cepa</i>)	Castellani	+	34 anos	Passador et al., (2010)
<i>F. oxysporum</i>	<i>Ruta</i> sp. (arruda)	Castellani	S.I.	1 ano e 2 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>F. oxysporum</i>	S.I.	Liofilização	S.I.	20 anos e 10 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>F. oxysporum</i>	S.I.	-80°C	S.I.	8 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>F. oxysporum</i>	S.I.	Papel filtro modificado	S.I.	4 anos	Fong et al. (2000)
<i>F.oxysporum</i> f. <i>dianthi</i>	<i>Dianthi caryophyllus</i> (cravo)	Castellani	S.I.	3 anos e 4 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raça 2	S.I.	Clamisdosporos em pó de talco (5°C)	+	1 ano	Bueno (2004)
<i>Fusarium</i> spp.	S.I.	Sílica-gel (5 °C)	S.I.	5 anos	Dhingra e Sinclair (1995)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>Fusarium</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	8 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Ganoderma</i> spp	S.I.	Papel filtro modificado	S.I.	5 meses	Fong et al. (2000)
<i>Gloeosporium musarum</i>	Banana	Castellani	S.I.	7 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Helminthosporium carbonum</i>	S.I.	Tecidos secos do hospedeiro (5°C)	S.I.	10-15 anos	Menezes e Silva-Hanlin (1997)
<i>H. maydis</i>	S.I.	Tecidos secos do hospedeiro (5°C)	S.I.	10-15 anos	Menezes e Silva-Hanlin (1997)
<i>Helminthosporium</i> spp.	Gengibre	Castellani	S.I.	13 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>Helminthosporium</i> spp.	S.I.	Óleo mineral	S.I.	7 anos	Menezes et al. (1997)
<i>H. turcicum</i>	S.I.	Tecidos secos do hospedeiro (5°C)	S.I.	10-15 anos	Menezes e Silva-Hanlin (1997)
<i>Lasiodiplodia thobramae</i>	S.I.	-80°C	S.I.	9 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Milho (colmos)	Tecidos secos do hospedeiro	S.I.	16-18 meses	Cook et al. (1973)
<i>M. phaseolina</i>	S.I.	Microescleródios (5°C)	+	1 ano	Bueno (2004)
<i>M. phaseolina</i>	S.I.	Terrço (5°C)	S.I.	1 ano	Bueno (2004)
<i>M. phaseolina</i>	S.I.	-20°C	S.I.	2 meses	Bueno et al. (2006)
<i>M. phaseolina</i>	S.I.	-80°C	S.I.	1 mês	Aparecido et al. (2012)
<i>Macrophomina</i> spp.	S.I.	Microescleródios sobre palitos de madeira (T°C ambiente)	S.I.	5 anos	Singleton et al. (1992); Mihail (1992)
<i>Marasmiellus inoderma</i>	S.I.	Papel filtro modificado	S.I.	2 anos	Fong et al. (2000)
<i>Melanconium fuligenum</i>	S.I.	-80°C	S.I.	7 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Monilia</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	3 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Mucor plumbeus</i>	S.I.	Liofilização	S.I.	20 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Mycosphaerella melonis</i> (<i>Dydimella bryonide</i>)	Mamão	Castellani	S.I.	11 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>P. melanocephala</i>	S.I.	Desidratados e em -23°C	+	90 dias	Autrey et al. (1996)
<i>Penicillium italicum</i>	Laranja (frutos)	Repicagens periódicas	-	45 anos	Pires et al. (2012)
<i>P. italicum</i>	Laranja (frutos)	Castellani	-	12 anos	Pires et al. (2012)
<i>P. italicum</i>	Laranja (frutos)	Liofilização	+	22 anos	Pires et al. (2012)
<i>Pestalotia</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	18 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Phoma</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	2 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Phytophthora capsicii</i>	Cacau (mudas)	Castellani	S.I.	12 anos e 7 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>P. citrophthora</i>	Laranja (frutos)	Repicagens periódicas	+	72 anos	Pires et al. (2012)
<i>P. citrophthora</i>	S.I.	-80°C (Papel filtro)	S.I.	29 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>Phytophthora</i> spp.	Laranja (frutos)	Repicagens periódicas	-	44 anos	Pires et al. (2012)
<i>Phytophthora</i> spp.	Laranja (frutos)	Repicagens periódicas	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>Phytophthora</i> spp.	Laranja (frutos)	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>Phytophthora</i> spp.	S.I.	Nitrogênio líquido	S.I.	5-6 anos	Singleton (1992)
<i>Phytophthora</i> spp.	S.I.	-80°C (Sorgo)	S.I.	29 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>Phytophthora</i> spp.	S.I.	-80°C (Papel filtro)	S.I.	31 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>Pithomyces</i> spp.	<i>Brachiaria decumbens</i>	Liofilização	S.I.	20 anos e 10 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Pythium aphanidermatum</i>	S.I.	-80°C (Papel filtro)	S.I.	31 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>P. aphanidermatum</i>	S.I.	-80°C	S.I.	19 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>P. irregulare</i>	S.I.	-80°C (Sorgo)	S.I.	29 meses	Aparecido et al. (2013)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>P. irregulare</i>	S.I.	-80°C (Papel filtro)	S.I.	29 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>Pythium</i> spp.	S.I.	Castellani (sementes de linho em água deionizada)	S.I.	5 anos	Singleton et al. (1992)
<i>Pythium</i> spp.	S.I.	Nitrogênio líquido	S.I.	5-6 anos	Singleton (1992)
<i>Pythium</i> spp.	S.I.	-80°C (Sorgo)	S.I.	29 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>Pythium</i> spp.	S.I.	-80°C (Papel filtro)	S.I.	29 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>P. undulatum</i>	S.I.	-80°C (Papel filtro)	S.I.	29 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>P. vexans</i>	S.I.	-80°C (Papel filtro)	S.I.	31 meses	Aparecido et al. (2013)
<i>Rhizoctonia papayae</i>	S.I.	-80°C	S.I.	8 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>R. solani</i>	S.I.	Óleo mineral	S.I.	5 anos	Dhingra e Sinclair (1995)
<i>R. solani</i>	S.I.	Nitrogênio líquido	S.I.	5-6 anos	Singleton (1992)
<i>R. solani</i>	S.I.	Nitrogênio líquido	S.I.	5-6 anos	Carling e Sumner (1992)
<i>Rhizoctonia</i> spp.	S.I.	Meio BDA (T°C ambiente)	S.I.	1 ano	Carling e Sumner (1992)
<i>Rhizoctonia</i> spp.	S.I.	Meio PDYA (T°C ambiente)	S.I.	6-12 meses	Carling e Sumner (1992)
<i>Rhizoctonia</i> spp.	<i>Diets</i> sp. (moréia)	Castellani	S.I.	2 anos e 9 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>Rhizoctonia</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	8 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	S.I.	Escleródios (-20°C)	+	1 anos	Bueno (2004)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	S.I.	Óleo mineral (T°C ambiente)	S.I.	5 anos	Punja e Rahe (1992)
<i>S. rolfsii</i>	S.I.	escleródios (T°C ambiente)	+	1 ano	Bueno (2004))
<i>Sclerotium</i> spp.	S.I.	-80°C	S.I.	7 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Stemphylium</i> spp.	S.I.	Óleo mineral	+	5 a 12 anos	Menezes et al. (1997)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>Thielaviopsis sp.</i>	S.I.	Tecidos secos do hospedeiro	S.I.	3 anos	Singleton et al. (1992)
<i>Thielaviopsis spp.</i>	S.I.	-80°C	S.I.	6 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>T. paradoxa</i>	Abacaxi (frutos)	Repicagens periódicas	+	44 anos	Pires et al. (2012)
<i>T. paradoxa</i>	Abacaxi (frutos)	Castellani	+	7 anos	Pires et al. (2012)
<i>T. paradoxa</i>	Banana (frutos)	Repicagens periódicas	+	37 anos	Pires et al. (2012)
<i>T. paradoxa</i>	Banana (frutos)	Castellani	+	37 anos	Pires et al. (2012)
<i>Trichoderma stromaticum</i>	Cacaueiro (antagonista a <i>Crinipellis perniciosa</i>)	Tecidos secos do hospedeiro	S.I.	4 anos	Bastos (2008)
<i>T. viridii</i>	Plantação cacau (solo)	Castellani	S.I.	10 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>Verticillium spp.</i>	S.I.	Meio BDA (T°C ambiente)	S.I.	1-2 anos	Melouk (1992)
<i>V. albo-atrum</i>	Batata	Repicagens periódicas	+	32 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. albo-atrum</i>	Batata	Castellani	+	32 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. albo-atrum</i>	Batata	Castellani	S.I.	12 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>V. albo-atrum</i>	Batata	Repicagens periódicas	+	31 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. albo-atrum</i>	Batata	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. albo-atrum</i>	S.I.	-80°C	S.I.	18 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Repicagens periódicas	+	21 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Tomateiro	Repicagens periódicas	+	40 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Repicagens periódicas	+	40 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Castellani	+	12 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Amendoim var. Tatu	Repicagens periódicas	+	39 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Amendoim var. Tatu	Castellani	+	12 anos	Finatti e Aparecido (2009)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>V. dahliae</i>	Quiabo	Castellani	+	6 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Quiabo	Repicagens periódicas	+	6 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Jiló	Repicagens periódicas	+	6 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Jiló	Castellani	+	6 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Jiló	Óleo mineral	+	5 anos	Finatti e Aparecido (2009)
<i>V. dahliae</i>	Tomateiro	Castellani	S.I.	2 anos e 6 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>V. dahliae</i>	Amendoim	Castellani	S.I.	11 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Castellani	S.I.	11 anos e 6 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>V. dahliae</i>	Roseira	Castellani	S.I.	12 anos e 11 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>V. dahliae</i>	Quiabo	Castellani	S.I.	5 anos	Aparecido et al. (2007)
<i>V. dahliae</i>	<i>Lycopersicum sculentum</i> (tomateiro)	Liofilização	S.I.	20 anos e 9 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>V. dahliae</i>	<i>Solanum melogena</i> (berinjela)	Liofilização	S.I.	20 anos e 8 meses	Aparecido et al. (2007)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Repicagens periódicas	+	20 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Algodão	Repicagens periódicas	-	44 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Algodão	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Tomate	Repicagens periódicas	+	39 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Tomate	Castellani	-	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Repicagens periódicas	+	39 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Amendoim	Repicagens periódicas	+	38 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Amendoim	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)

(...continua...)

ANEXO A, Cont.

<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Repicagens periódicas	+	38 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Amendoim	Repicagens periódicas	+	38 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Amendoim	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Repicagens periódicas	+	38 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Berinjela	Castellani	+	11 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	S.I.	Colônias secas com sulfato de cálcio (T°C ambiente)	S.I.	2 anos	Singleton et al. (1992)
<i>V. dahliae</i>	S.I.	Microescleródios (-20°C)	-	1 ano	Bueno (2004)
<i>V. dahliae</i>	S.I.	Terriço (5°C)	S.I.	5 anos	Melouk (1992)
<i>V. dahliae</i>	S.I.	Terriço (-20°C)	S.I.	1 ano	Bueno (2004)
<i>V. dahliae</i>	S.I.	-80°C	S.I.	18 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>V. dahliae</i>	Jiló (<i>Solanum gilo</i>)	Repicagens periódicas	+	6 anos	Passador et al. (2010)
<i>V. dahliae</i>	Jiló (<i>Solanum gilo</i>)	Castellani	+	6 anos	Passador et al. (2010)
<i>V. fungicola</i>	Champignon (<i>A. bisporus</i>)	Castellani	+	13 anos	Pires et al. (2012)
<i>V. fungicola</i>	S.I.	-80°C	S.I.	19 meses	Aparecido et al. (2012)
<i>Volutela</i> spp..	Alface d'água	Castellani	S.I.	3 anos e 7 meses	Aparecido et al. (2007)

*S.I.: Sem informações; (-) Não; (+) Sim.