

## AValiação de dois métodos de preservação de *Cercospora coffeicola*<sup>1</sup>

Deila Magna dos Santos Botelho<sup>2</sup>; Mário Lúcio Vilela de Resende<sup>3</sup>; Pedro Martins Ribeiro Júnior<sup>4</sup>; Flávia Rodrigues Alves Patrício<sup>5</sup>; Eliane Arantes Pereira<sup>6</sup>; Camila Aparecida Carvalho<sup>7</sup>; Stéfanny Araújo Martins<sup>8</sup>, Manoel Batista da Silva Júnior<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)

<sup>2</sup> Pós doutoranda, Capes, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, deilamagna@hotmail.com

<sup>3</sup>Professor, PhD, Universidade Federal de Lavras Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, mlucio@dfp.ufla.br

<sup>4</sup>Pós doutorando, CNPq, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, ribeirojuniorpm@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Pesquisador, DSc, Instituto Biológico de Campinas Laboratório de Fitopatologia, Caixa Postal 70, Campinas, SP, flavia@biologico.sp.gov.br

<sup>6</sup>Bolsista, CNPq, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, elianeearantes@hotmail.com

<sup>7</sup>Bolsista, CNPq, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, camila.carvalho29@hotmail.com

<sup>8</sup>Bolsista, INCT Café/CNPq, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, sta.martins@hotmail.com

<sup>9</sup>Bolsista, CNPq, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, mjunior\_agroufla.com.br

**RESUMO:** A preservação de isolados de fitopatógenos é importante, pois possibilita a realização de pesquisas, tanto básicas como aplicadas, a qualquer tempo. Uma boa técnica de preservação caracteriza-se por manter as características originais dos fitopatógenos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade. A cercosporiose é uma das mais importantes doenças do cafeeiro. Seu agente etiológico, o fungo *Cercospora coffeicola*, apresenta limitações quanto ao isolamento, crescimento micelial e esporulação *in vitro*. Desta forma, é necessária uma boa técnica de preservação de isolados de *C. coffeicola* para estudos no patossistema cafeeiro-cercosporiose. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi verificar a eficácia de dois métodos de preservação em cinco isolados de *C. coffeicola* de diferentes regiões produtoras de café. Foram avaliados os métodos de preservação: em papel filtro esterilizado e discos com micélio do fungo em meio de cultura, ambos armazenados em microtubos do tipo Eppendorf. Os microtubos contendo papel filtro foram armazenados a -20 °C e os microtubos contendo os discos de micélio foram armazenados em temperatura ambiente. Após seis meses de armazenamento, os isolados conservados nos dois métodos de preservação foram plaqueados em meio V8 para a avaliação da recuperação. Avaliou-se também a esporulação dos isolados armazenados nos dois métodos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2 (isolados x métodos) e quatro repetições. Observou-se que os dois métodos de preservação foram eficientes na conservação dos isolados de *C. coffeicola* proporcionando 100% de recuperação. Os tipos de preservação avaliados não inibiram a esporulação dos isolados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cercosporiose, esporulação, fungo

### EVALUATION OF TWO METHODS FOR PRESERVATION OF *Cercospora coffeicola*

**ABSTRACT:** The preservation of isolated pathogens is important because it enables the conduct of research, both basic and applied at any time. A good preservation technique is characterized by maintaining the original characteristics of pathogens, such as the ability to sporulate and pathogenicity. Brown eye spot is an important disease of coffee. Its agent, the fungus *Cercospora coffeicola* has limitations for isolation, mycelial growth and sporulation *in vitro*. Thus, it is necessary a good preservation technique for *C. coffeicola* for studies in coffee-gray leaf spot pathosystem. Therefore, the aim of this work was to verify the effectiveness of two methods for preservation of five *C. coffeicola* isolates collected from different coffee growing regions. The two preservation methods evaluated were: sterile filter paper discs and mycelium of the fungus in the culture medium, both stored in Eppendorf microtubes. The microtubes containing filter paper were stored at -20 °C and the microtube containing the mycelial discs were stored at room temperature. After six months of storage, the isolates from the two methods of preservation were grown on V8 medium to evaluate the recovery. The sporulation of isolates after six months of preservation in the two tested methods was evaluated. The experiment was conducted in completely randomized design in a factorial 5x2 (isolated x methods) and four replicates. It was observed that both were effective methods for preservation of *C. coffeicola* giving 100% recovery. The types of preservation evaluated not inhibited sporulation of the isolates.

**KEYS WORDS:** Brown eye spot, sporulation, fungi

## INTRODUÇÃO

A cercosporiose, doença cujo agente etiológico é o fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, é considerada uma das principais doenças do cafeeiro em várias regiões produtoras (Carvalho et al., 2002). A doença causa lesões nas folhas, que caem rapidamente (Godoy et al., 1997), pode derrubar os frutos em expansão (Matiello, 1991) e prejudicar a qualidade da bebida (Godoy et al., 1997; Zambolim et al., 1997). Seu agente etiológico, apresenta limitações quanto ao isolamento, crescimento micelial e esporulação *in vitro*. De acordo com Aparecido et al. (2001), a preservação de fungos fitopatogênicos por longos períodos de tempo é importante para que pesquisas possam ser realizadas a qualquer momento. A manutenção desses fungos em certos meios de cultura requer muitos cuidados, pois os consomem rapidamente e necessitam repicagens frequentes, gastando tempo, possibilitando sua contaminação e diminuição da virulência (Costa et al., 1991; Kirsop & Doyle, 1984). Os principais métodos de preservação utilizados são temperaturas baixas ou congelamento, nitrogênio líquido, sílica gel, solo ou areia, tecido seco de hospedeiro infectado, repicagens periódicas, água destilada ou método de Castellani, liofilização e óleo mineral (Bueno, 2006). Dell'acqua et al. (2009) avaliando a preservação de sete isolados de *C. coffeicola* pelos métodos de preservação: Castellani, preservação em frascos tipo Eppendorf nas temperaturas ambiente, -18 °C; 10°C, liofilização e congelamento a -80 °C observaram que os isolados permaneceram viáveis após seis meses de preservação em todos os métodos testados, com exceção da preservação em frascos tipo Eppendorf na temperatura de -18 °C, onde as colônias perderam a viabilidade após três meses de preservação. Segundo Dhingra & Sinclair (1995), não existe nenhum método universal para armazenar patógenos de plantas, pois a seleção do método deve ser baseada na natureza do patógeno e nas suas vantagens e desvantagens. Além disso, o método de preservação deve manter as características originais dos fitopatógenos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade. Com isto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar dois métodos de preservação de *C. coffeicola* e verificar a possível interferência dos métodos na capacidade de esporulação de cinco isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos isolados

Foram utilizados cinco isolados de *C. coffeicola*: LFP 04 (Nepomuceno-MG); LFP12 (Lavras-MG); LFP 21 (Três Pontas-MG); LFP 29 (Perdões-MG) e LFP 37 (Bonfinópolis de Minas-MG). Os isolados foram preservados em dois métodos: fragmentos de papel filtro e discos de micélio de *C. coffeicola* preservados em microtubos de 2 mL do tipo eppendorf em temperatura ambiente. A preservação nos dois métodos foi realizada no dia 13/12/2012 e a avaliação da viabilidade realizada em 13/06/2013, totalizando seis meses de preservação.

### Preservação em fragmentos de papel-filtro

A preservação em tiras de papel foi realizada de acordo com Alfenas e Mafia (2007). Tiras de papel filtro esterilizados (2,5 x 0,7 cm), foram depositados sobre meio de cultura V8. Posteriormente, os discos com diferentes isolados foram repicados para as placas visando proporcionar o crescimento do fungo sobre os fragmentos de papel. As placas foram incubadas por 20 dias a 25 °C e luz contínua. Após o crescimento micelial sobre os fragmentos de papel, os mesmos foram transferidos para placas de Petri estéreis, e permaneceram em incubadora nas mesmas condições pelo período de 10 dias para a secagem das tiras de papel contendo o micélio do fungo. Posteriormente, os fragmentos de papel foram transferidos para microtubos de 2 mL e armazenados a -20°C. Foram armazenados quatro tiras de papel com o fungo por frasco e quatro frascos por isolado.

### Preservação de discos de micélio

Discos de micélio (6 mm de diâmetro) de meio V8 provenientes de colônias dos cinco isolados de *C. coffeicola* avaliados foram depositados em microtubos de 2 mL do tipo Eppendorf e armazenados à temperatura ambiente. Foram depositados quatro discos de micélio por tubo e quatro tubos por isolado.

### Esporulação de *C. coffeicola*

Para a avaliação da esporulação, quinze discos de micélio de 6 mm de diâmetro, retirados de colônias de *C. coffeicola* com 15 dias de idade, dos cinco isolados recuperados após seis meses de armazenamento nos dois métodos de preservação, foram macerados com 400 µL de água destilada esterilizada. O micélio macerado de cada isolado foi depositado em erlenmeyers contendo 20 mL do meio de cultura V8 líquido (100 mL de V8, 900 mL de água destilada) e agitados a 100 rpm por quatro dias em temperatura ambiente. Posteriormente, o líquido contendo o micélio foi vertido em placas contendo ágar-água e as mesmas permaneceram abertas em BOD por dois dias para a secagem do líquido. Após a secagem, foi adicionado em cada placa 10 mL de água esterilizada para a remoção dos conídios com o auxílio de alça de Drigasliki. O líquido contendo os conídios foi filtrado em gaze para a retirada dos resíduos e a esporulação foi quantificada em câmara de Neubauer.

### Delineamento experimental e análise dos dados

Para teste de preservação dos isolados o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2 (isolados e métodos) e quatro repetições. As médias quando significativas pelo teste F foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após seis meses de armazenamento, observou-se que os dois métodos os dois métodos avaliados foram eficientes na preservação dos cinco isolados de *C. coffeicola*, resultando em 100% de recuperação (Tabela 1). Todas as placas contendo os cinco isolados apresentaram crescimento micelial típico aos 10 dias após a repicagem. O maior tamanho das colônias observado no método de preservação em papel filtro justifica-se pela maior superfície inicial deste método (2,5 x 0,7 cm) quanto comparado ao disco de micélio (6 cm) (Figura 1). Dell'Acqua et al. (2009), avaliando métodos de preservação para isolados de *C. coffeicola*, verificaram que no método de preservação em microtubos armazenados em temperatura ambiente, as colônias de todos os isolados permaneceram viáveis após três e seis meses de preservação. Segundo Sette (2013), a preservação em papel filtro, apresenta como vantagens o baixo custo, a não exigência de equipamentos especiais, estabilidade elevada e a não ocorrência de ácaros devido à baixa temperatura.

Tabela 1. Porcentagem de recuperação dos isolados preservados pelos métodos papel filtro e disco de micélio de *C. coffeicola* depositados em microtubos, após seis meses de armazenamento.

Isolados	Método de preservação	
	Papel filtro	Disco de micélio
LFP 04	100	100
LFP12	100	100
LFP 21	100	100
LFP 29	100	100
LFP 37	100	100

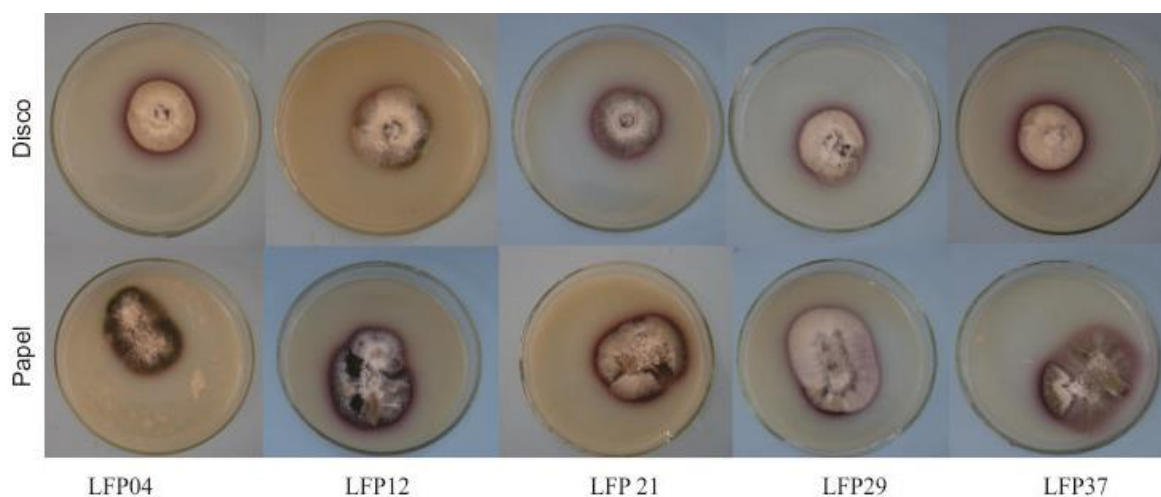


Figura 1 Recuperação de isolados de *C. coffeicola* preservados em papel filtro (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) e discos de micélio (temperatura ambiente) depositados em microtubos de 2 mL, após seis meses de armazenamento.

Todos os isolados esporularam nos dois métodos testados, após seis meses de preservação (Tabela 2). Apesar da diferença observada entre os isolados com relação à esporulação pode ser explicada pela variabilidade genética dos isolados. Os métodos de preservação testados atenderam uma exigência citada como importante por Aparecido et al. (2001), que é manter as características originais dos fitopatógenos, tais como capacidade de esporular e patogenicidade.

Tabela 2 Esporulação ( $\times 10^4$  esporos/mL) de isolados de *C. coffeicola* preservados por dois métodos, o de papel de filtro e o de disco de micélio, após seis meses de preservação.

Isolados	Método de preservação	
	Papel filtro	Disco de micélio
LFP 04	1,62 c	3,12 bc
LFP 12	4,68 b	4,75 b
LFP 21	8,43 a	6,81a
LFP 29	6,93 a	8,56 a
LFP 37	1,81 c	2,56 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## CONCLUSÃO

Os métodos de preservação testados, tiras de papel filtro e conservação de disco de micélio em microtubos foram eficientes na conservação de cinco isolados de *C. coffeicola* por seis meses, sem afetar a capacidade de esporulação dos mesmos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do café (INCT do Café) e Fapemig pelo apoio na condução do trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**, p.98-99, 2007.
- APARECIDO, C.C.; EGYDIO, A.P.M.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa-Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, n.4, p.421-424, 2001.
- BUENO, C.J. Métodos de preservação para fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 3, n.2, Jul-Dez 2006. Disponível em <[http://www.apta regional.sp.gov.br/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=400&Itemid=284](http://www.apta regional.sp.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=400&Itemid=284)>. Acesso em 10/06/2013.
- CARVALHO, V.L.; CUNHA R.L.; CHALFOUN S.M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, v. 23, p.101-114, 2002.
- COSTA, C.P., FERREIRA, M.C. Preservação de microrganismos. **Rev Bras Microbiol.**; v.22:263-268, 1991.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
- 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.
- GODOY, C. V., BERGAMIN FILHO, A. & SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. Vol.2. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo-SP. Ceres. 1997. pp.184-200.
- KIRSOP, B.E., DOYLE, A. Maintenance of microorganisms and cultured cells – **A manual of laboratory methods**. 2ª ed. London: Academic Press Inc; 1984.
- MATIELLO, J.B. **O café do cultivo ao consumo**. São Paulo, Globo Rural. 1991.
- SETTE, L.D. Técnicas de Preservação de Microrganismos. Disponível em <[www.cria.org.br/eventos/confmt/presentations/Preservacao.ppt](http://www.cria.org.br/eventos/confmt/presentations/Preservacao.ppt)>. Acesso em 22/06/2013
- ZAMBOLIM, L., DO VALE, F. X. R., PEREIRA, A. A. & CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.) - Controle de Doenças. In: Do Vale, F. X. R. & Zambolim, L. (Eds.). **Controle de Doenças de Plantas - Grandes Culturas**. Vol.1. Viçosa. 1997. pp.83-180