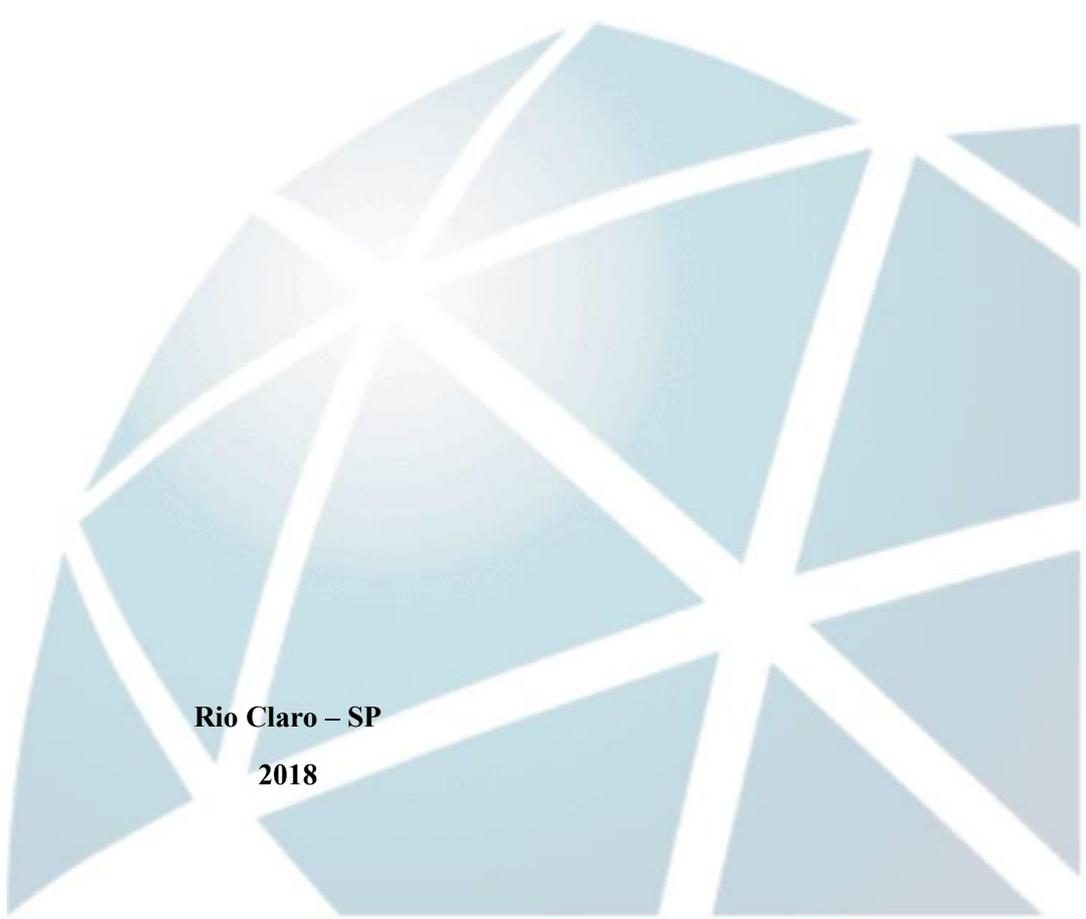

ECOLOGIA

LUCIANA SIMÃO CARNEIRO

**PRESERVAÇÃO DE CULTURAS DE
FUNGOS DO GÊNERO *Escovopsis***

Rio Claro – SP

2018



LUCIANA SIMÃO CARNEIRO

PRESERVAÇÃO DE CULTURAS DE FUNGOS
DO GÊNERO *Escovopsis*

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientadora: Dr^a. Lorena Tigre Lacerda

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Ecóloga.

Rio Claro – SP

2018

C289p Carneiro, Luciana Simão
Preservação de culturas de fungos do gênero Escovopsis
/ Luciana Simão Carneiro. -- Rio Claro, 2018
41 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -
Ecologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: André Rodrigues
Coorientadora: Lorena Tigre Lacerda

1. Coleção de cultura. 2. Métodos de preservação. 3.
Fungo. 4. Viabilidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RESUMO

Fungos do gênero *Escovopsis* são considerados micoparasitas do fungo cultivado pelas formigas atíneas. A preservação em longo prazo de culturas de *Escovopsis* é essencial para estudos taxonômicos e aplicados, principalmente, aqueles voltados para o controle biológico das formigas cortadeiras, consideradas pragas agrícolas. Neste trabalho foram avaliados três métodos de preservação de culturas de *Escovopsis*: Castellani, Criopreservação (-80 °C) e Sílica-gel. Foram selecionados 16 isolados de *Escovopsis* dentre aqueles depositados no acervo da Central de Recursos Microbianos. Esses isolados são espécies ainda não descritas, distintas principalmente pela coloração dos conídios (marrom, rosa e amarelo). Durante dez meses de preservação nesses métodos, foram avaliados: o crescimento micelial, viabilidade dos conídios e características macromorfológicas das colônias. Adicionalmente, avaliamos dois outros métodos de preservação para um subconjunto de oito, dentre os 16 isolados de *Escovopsis*: Solo suplementado com extrato fúngico e Liofilização. Os métodos de Criopreservação e Castellani mantiveram todos os isolados vivos durante os dez meses de preservação. Isolados criopreservados apresentaram maior crescimento micelial e viabilidade de conídios, quando comparados com os isolados mantidos nas demais técnicas. O método de Sílica-gel não foi adequado para a preservação de *Escovopsis*, pois os isolados apresentaram menor crescimento e viabilidade, quando comparado às outras técnicas. As características macroscópicas das colônias de todos os isolados foram afetadas pelo método e tempo de preservação. Após dez meses de preservação, 71% dos isolados de *Escovopsis* mantidos pelo método de Solo com extrato estavam viáveis, enquanto que apenas 37% dos isolados liofilizados estavam vivos. O crescimento micelial foi maior nos isolados preservados em Solo, durante todos os meses de avaliação. No entanto, para ambas as técnicas, houve decréscimo da viabilidade dos conídios a partir do sexto mês de preservação. No geral, observamos que cada isolado responde de maneira distinta aos diferentes métodos. Entretanto, dentre todas as técnicas avaliadas, constatamos que Criopreservação, Castellani e Solo com extrato foram os métodos mais adequados para preservação de *Escovopsis*.

Palavras-chaves: Coleção de cultura. Métodos de preservação. Fungo. Viabilidade.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 5 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 2.1 | Preservação de culturas | 7 |
| 2.1.1 | Castellani | 7 |
| 2.1.2 | Criopreservação | 8 |
| 2.1.3 | Sílica-gel..... | 9 |
| 2.1.4 | Liofilização | 9 |
| 2.1.5 | Solo..... | 10 |
| 2.2 | O gênero <i>Escovopsis</i> | 11 |
| 3 | OBJETIVO | 13 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 4.1 | Preparação dos isolados para preservação..... | 14 |
| 4.2 | Preservação das culturas..... | 15 |
| 4.2.1 | Castellani | 15 |
| 4.2.2 | Criopreservação (-80 °C)..... | 15 |
| 4.2.3 | Sílica-gel..... | 15 |
| 4.2.4 | Liofilização | 16 |
| 4.2.5 | Solo suplementado com extrato..... | 16 |
| 4.3 | Reativação dos isolados pós-preservação..... | 17 |
| 4.4 | Avaliação dos isolados pós-preservação: controle de qualidade..... | 17 |
| 4.4.1 | Culturas viáveis | 17 |
| 4.4.2 | Avaliação do crescimento micelial..... | 18 |
| 4.4.3 | Avaliação da viabilidade dos conídios | 18 |
| 4.4.4 | Avaliação da macromorfologia das colônias..... | 18 |
| 4.5 | Análise dos dados | 19 |
| 5 | RESULTADOS | 20 |
| 5.1 | Preservação em Castellani, Criopreservação e Sílica-gel..... | 20 |
| 5.1.1 | Culturas viáveis | 20 |
| 5.1.2 | Crescimento micelial | 20 |
| 5.1.3 | Viabilidade de conídios | 22 |
| 5.1.4 | Grupos de <i>Escovopsis</i> : marrom, rosa e amarelo..... | 22 |
| 5.1.5 | Macromorfologia | 24 |

| | | |
|----------|--------------------------------------|-----------|
| 5.2 | Liofilização e Solo com extrato..... | 26 |
| 5.2.1 | Culturas viáveis | 26 |
| 5.2.2 | Crescimento micelial | 27 |
| 5.2.3 | Viabilidade de conídios | 29 |
| 6 | DISCUSSÃO | 31 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES | 36 |
| | REFERÊNCIAS | 37 |

1 INTRODUÇÃO

A manutenção de coleções de culturas microbianas é fundamental para pesquisas básicas e aplicadas (PAOLI, 2005). A principal finalidade da preservação de culturas microbianas é manter os micro-organismos viáveis em longo prazo (ABD-ELSALAM et al., 2010). O método de preservação é fundamental e a escolha desse pode variar segundo o tipo de micro-organismo (NUZUM, 1989, RYAN; SMITH; JEFFRIES, 2000). Assim, devido às características particulares de cada espécie, não existe um método universal (NUZUM, 1989, RYAN; SMITH; JEFFRIES, 2000, QUINN et al., 2005). Portanto, é necessário considerar as vantagens e desvantagens das técnicas para cada espécie e avaliar quais devem ser empregadas (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Tal avaliação torna a aplicação de técnicas de preservação um desafio aos curadores, assim, uma padronização desses métodos é fundamental para a manutenção das culturas durante um maior espaço de tempo.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF, UNESP, Rio Claro, SP) reuniu, ao longo de dez anos, uma coleção com aproximadamente 1.200 isolados fúngicos. Dentre eles, o gênero *Escovopsis* é o mais representativo, com cerca de 385 isolados. Esses estão depositados no acervo da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), sendo a maior coleção existente desse fungo. O acervo apresenta uma elevada diversidade morfológica e genética do gênero, com prováveis novas espécies. Além da diversidade de espécies, os isolados são provenientes de várias localidades do continente americano. Contudo, apesar da grande importância da coleção, as culturas de *Escovopsis* apresentam adversidades quanto à preservação em longo prazo no laboratório.

Dentre os desafios da coleção estão: (i) todo o acervo está armazenado pelo método de Criopreservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e (ii) não existem estudos a respeito de métodos específicos para *Escovopsis*, em longo prazo, havendo a necessidade de manutenção periódica da coleção, a fim de evitar a perda dos isolados. Nesse contexto, a preservação do acervo é fundamental para a continuidade dos estudos taxonômicos e aplicados, a saber: sistemática e filogenia do gênero, produção de metabólitos, ecologia e controle biológico das formigas cortadeiras (saúvas).

Visando a importância dessa coleção, o presente projeto avaliou e comparou três técnicas principais para a preservação de *Escovopsis*, a saber: Castellani, Criopreservação ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e Sílica-gel. Os isolados foram avaliados pós-preservação, como controle de

qualidade, considerando: (a) isolados viáveis, (b) crescimento micelial, (c) viabilidade de conídios e (d) macromorfologia. Adicionalmente, o estudo abrangeu a avaliação das técnicas de Liofilização e Solo com extrato fúngico, considerando um subgrupo de isolados de *Escovopsis* para compreendermos o efeito de outras técnicas nesse gênero.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Preservação de culturas

A preservação de fungos não é uma tarefa corriqueira, pois compreende o uso de diferentes métodos que melhor se adequem a esses micro-organismos (DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005, KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Para a preservação e armazenamento de uma cultura, é necessário a redução do metabolismo celular (REUSSER, 1963), favorecendo a manutenção em longo prazo. Os micro-organismos devem ser mantidos em diferentes métodos, visando a garantia do armazenamento do isolado (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006). Cada micro-organismo apresenta suas peculiaridades, portanto, deve-se utilizar métodos específicos (ABREU; TUTUNJI, 2004). Existem inúmeras técnicas e adaptações focadas à preservação de micro-organismos, variando com as necessidades do pesquisador, acessibilidade e tecnologia. Alguns métodos são comumente empregados em coleções de cultura como: água destilada (Castellani), criopreservação, sílica-gel, liofilização e solo (ABREU; TUTUNJI, 2004, FIGUEIREDO, 2001, BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

2.1.1 Castellani

O método de preservação desenvolvido por Castellani (1939) é uma técnica simples e econômica. A técnica consiste em armazenar fragmentos de meio de cultivo com o isolado a ser preservado, em frascos de vidro contendo água destilada (CASTELLANI, 1967; FIGUEIREDO, 2001). A técnica tem demonstrado bons resultados em diferentes gêneros e espécies de fungos, mantendo as características macromorfológicas após a preservação (DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005; PALACIO et al., 2014; KARABIÇAK; KARATUNA; AKYAR, 2016). A viabilidade depende das particularidades do micro-organismo, e pode ser necessário aperfeiçoar a técnica para manter a estabilidade por longos períodos (BORMAN et al., 2006). Uma das vantagens dessa técnica é a capacidade de manter as características morfológicas do fungo, até mesmo de isolados que apresentam uma com maior plasticidade (DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005). Outra vantagem da técnica é a facilidade de transporte e manuseio das culturas (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992). A reativação das culturas demanda apenas a retirada dos

fragmentos da água, com auxílio de uma alça de platina, seguida de semeadura em meio de cultivo (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992). Apesar de tal facilidade, o armazenamento em Castellani apresenta algumas desvantagens. É necessário monitorar a coleção, a fim de evitar a evaporação da água e prevenir a contaminação das culturas por ácaros (LARONE, 1987).

2.1.2 Criopreservação

A técnica de Criopreservação consiste no armazenamento em baixas temperaturas, como ultra-freezer (-80 °C) e nitrogênio líquido (-196 °C, AGUIAR et al., 2012). Esse método permite a preservação de células de fungos, bactérias, vírus, tecidos, sendo animais ou vegetais, mantendo-os geneticamente estáveis (BROCKBANK; COVAULT; TAYLOR, 2007). A Criopreservação na temperatura de - 80 °C é o método mais utilizado para fungos e tem como objetivo conservar o organismo em temperaturas baixas, com auxílio de crioprotetores, como o glicerol (AGUIAR et al., 2012). O método reduz o metabolismo da célula e as funções são retomadas após o descongelamento, quando o micro-organismo é semeado em meio de cultivo (AGUIAR et al., 2012). No entanto, essa técnica pode ser nociva para alguns fungos (FIGUEIREDO, 2001). A formação de cristais no meio intracelular pode provocar o rompimento da célula, inviabilizando o isolado (AGUIAR et al., 2012). É fundamental que a Criopreservação ocorra sem a formação dos cristais, com isso, frequentemente são utilizadas substâncias protetoras para a célula. A principal função dessas substâncias é prevenir a cristalização e reduzir a entrada da água na célula (COSTA, 2010). Além disso, a função dos crioprotetores é minimizar o estresse físico e químico causado pelo congelamento e degelo das células (AGUIAR et al., 2012).

Um exemplo de excelente crioprotetor é o glicerol. Essa substância atua penetrando na membrana da célula, permanecendo nessa estrutura e no citoplasma (PARKS; GRAHAM, 1992). Os crioprotetores penetrantes realizam um rearranjo de lipídeos e proteínas, aumentando a fluidez da membrana (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Inicialmente foi utilizado em diferentes concentrações em suspensão de *Escherichia coli*, mantendo-a viável por seis meses com temperatura de - 20 °C (KEITH, 1913). Entretanto, já foi relatada a expressão de efeitos tóxicos nas células (CURRY, 2000, HUBALEK, 2003). A utilização de glicerol em altas concentrações pode causar lesões aos micro-organismos (FAHY, 1986; FAHY, 2010). Pode causar, por exemplo, danos ao citoplasma, como na organização citoplasmática, alterar a bicamada lipídica prejudicando

as proteínas da membrana e o glicocálix (HAMMERSTEDT; GRAHAM, 1992). Assim, a concentração de cada crioprotetor depende da resistência do micro-organismo a ser preservado.

2.1.3 Sílica-gel

O método de Sílica-gel, desenvolvido por Perkins (1962), é de baixo custo e permite o armazenamento de fungos que apresentam elevada esporulação. Os conídios são primeiramente envoltos com leite desnatado e, em seguida, armazenados em sílica-gel (PERKINS, 1962). A preservação ocorre inserindo suspensões ou fragmentos de culturas em tubos contendo sílica-gel anidra (PERKINS, 1962). Segundo o autor, a sílica-gel desidrata o conteúdo inserido no frasco em poucas horas, mantendo-o inerte e favorecendo o estoque em longo prazo. Contudo, a preservação das linhagens deve ser realizada com a utilização de um meio de cultivo apropriado para cada fungo (PERKINS, 1962).

Alguns fungos armazenados nessa técnica podem continuar viáveis por mais de dez anos (WINDELS; BURNES; KOMMEDAHL, 1993). A preservação em sílica-gel foi adequada para vários fungos, como *Aspergillus nidulans*, *Claviceps paspali*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus parasiticus* (BARRATT; JOHNSON; OGATA, 1965, GRIVELL; JACKSON 1969; MAYNE; BENNETT; TALLANT, 1971, MIZRAHI; MILLER, 1968). Entretanto, uma desvantagem é o baixo tempo de armazenamento para alguns isolados (2 a 4 anos), além de que outros fungos podem perder a capacidade de esporular (ONIONS, 1983, SMITH, 1993).

2.1.4 Liofilização

A técnica de Liofilização é constituída pela secagem de um material, removendo a água intracelular de materiais biológicos a partir da sublimação (MORGAN et al., 2006). Os frascos de vidro liofilizados são selados a vácuo e o risco de contaminação por outros micro-organismos é menor, quando comparado com outras técnicas (BUNSE; STEIGLEDER, 1991). Semelhante ao método de Castellani, a técnica de liofilização tende a conservar as características fenotípicas dos isolados. Segundo Bunse e Steigleder (1991), leveduras não apresentaram alterações em suas características bioquímicas, durante a liofilização e armazenamento em até seis meses. A liofilização permite um

armazenamento sem reativações por um longo prazo, variando entre 17 e 30 anos (SMITH; RYAN, 2003, COSTA et al., 2009).

No entanto, a liofilização também pode causar lesões aos micro-organismos. Os processos de resfriamento e sublimação podem causar danos genéticos às células (SMITH; RYAN, 2003, TAN, 1997). A utilização de crioprotetores, como o *Skim Milk*, reduz a possibilidade de efeitos adversos desse processo (SIMIONE; BROWN, 1991). Quando adicionados, os dissacarídeos têm a capacidade de estabilizar as proteínas durante a secagem, evitando a desnaturação (CARPENTER; CROWE, 1989). O crioprotetor utilizado é constituído de lactose e induz uma viscosidade dentro e em torno do micro-organismo, reduzindo a mobilidade molecular e protegendo as células (MORGAN et al., 2006).

Além do sucesso na preservação, o armazenamento pode ser crucial na qualidade da técnica em longo prazo. Após a realização da liofilização, o acondicionamento do frasco também influencia na viabilidade. A cultura pode ser mantida a temperatura ambiente, contudo, o ideal é manter a 4 °C, em baixa umidade, ao abrigo de luz e de oxigênio (DAY; STACEY, 2007, HOMOLKA, 2014, MORGAN et al., 2006, SMITH; RYAN; DAY, 2001). Para recuperação dos isolados deve ser utilizado água destilada ou um meio apropriado, possibilitando a eficiência na reativação das células (FIGUEIREDO, 2001).

2.1.5 Solo

A preservação em solo esterilizado é uma técnica simples e bastante utilizada para preservação de culturas fúngicas. O método de Solo passou a ser utilizado a partir do século XX, sendo descrito por diversos autores como Greene e Fred (1934) e Atkinson (1954). Essa técnica de preservação consiste na inoculação de esporos fúngicos em solo seco ou areia (FENNELL, 1960). Assim, os frascos são armazenados sem o crescimento fúngico. Outra forma de preservação é inocular uma suspensão de esporos e aguardar o crescimento no solo, para posteriormente armazenar a cultura (BAKERSPIGEL, 1953). Segundo Onions (1971), a sobrevivência dos isolados nessa técnica é maior do que aquela observada em tubos com ágar inclinado. A técnica também apresentou sucesso na preservação de vários fitopatógenos, a saber: *Septoria*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* e *Pseudocercospora* (SHEARER; ZEYEN; OOKA, 1974, SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991, REINECKE; FOKKEMA, 1979, WINDELS; BURNES; KOMMEDAHL, 1993).

Contudo, o método também apresenta desvantagens, pois foram relatadas a ocorrência de mutações durante o período de armazenamento, como o observado em *Fusarium equiseti* (BOOTH et al., 1971, SMITH; RYAN; DAY, 2001).

2.2 O gênero *Escovopsis*

As formigas pertencentes à subtribo Attina (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae), apresentam como principal característica o cultivo de fungos para alimentação (MUELLER et al., 2008, VARANDA-HAIFIG et al., 2017, WEBER, 1972). Um subgrupo de espécies dessa subtribo, conhecido como formigas cortadeiras, utiliza folhas e flores frescas para o cultivo do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Esse hábito de cortar folhas apresenta um papel ecológico importante para o ecossistema, especialmente na ciclagem de nutrientes (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Contudo, esses insetos ocasionam sérios prejuízos econômicos na agricultura, sendo consideradas pragas de diferentes culturas como: eucalipto, cacau, pinheiro, entre outras (BOARETTO; FORTI, 1997, DE ABREU; DELABIE; 1986, DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Geralmente, com intuito de diminuir os danos causados por esses insetos são utilizados inseticidas prejudiciais ao ecossistema, assim o controle biológico é aspirado como um método alternativo (FOLGARAIT et al., 2011).

A interação obrigatória entre as formigas atíneas e o fungo mutualista sofre grande influência de diversos micro-organismos, incluindo o micoparasita especializado do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales). Esse fungo se alimenta das hifas do fungo mutualista, retardando o crescimento das colônias (CURRIE, 2001; REYNOLDS; CURRIE, 2004). Por tal ação, *Escovopsis* pode ser considerado uma alternativa de controle biológico das formigas cortadeiras, porém estudos nesse sentido ainda são escassos. Alguns autores sugerem que esse micoparasita co-evoluiu em associação com as formigas e o fungo mutualista, proporcionando o surgimento de diversos grupos de *Escovopsis* (CURRIE et al., 2003, GERARDO; MUELLER; CURRIE, 2006, MEIRELLES et al., 2015). O fungo mutualista é transmitido verticalmente pelas rainhas fundadoras, enquanto que *Escovopsis* é possivelmente transmitido horizontalmente entre colônias (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999). Esses fatores sugerem a origem da co-evolução nos estágios iniciais do cultivo de fungos pelas formigas (MUELLER et al., 2001). Provavelmente, o parasitismo de *Escovopsis* se iniciou de um parasita de fungos

agaricáceo de vida livre, invadindo a simbiose das atíneas há cerca de 55 a 60 milhões de anos atrás (CURRIE et al., 2003). *Escovopsis* apresenta características genéticas e morfológicas particulares, por exemplo, a presença de vesículas (globosa e cilíndrica), a coloração dos conídios (i. e. esporos de cor amarela, rosa e marrom) e ornamentações nessas estruturas (MEIRELLES et al., 2015).

Em condições de laboratório e campo, os isolados de *Escovopsis* produzem grande quantidade de conídios (i. e. esporos assexuados) e destes, apenas uma pequena porção é viável (RODRIGUES et al., 2008). No estudo de Reynolds e Currie (2004), os isolados de *Escovopsis* apresentaram maior crescimento quando na presença do fungo mutualista. Segundo Augustin et al. (2017), a presença dos metabólitos advindos do hospedeiro pode induzir *Escovopsis* na reativação da dormência. Os autores afirmam que a dormência é quebrada na presença do hospedeiro, o que revela uma adaptação para a transmissão desse parasita.

3 OBJETIVO

Caracterizar a aplicabilidade de cinco métodos de preservação para fungos do gênero *Escovopsis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação dos isolados para preservação

Foram selecionados 16 isolados de *Escovopsis* spp., provenientes da CRM-UNESP, para preservação em Castellani, Criopreservação (-80 °C) e Sílica-gel. A seleção foi baseada na formiga de origem e na coloração distinta dos conídios (amarelo, marrom e rosa), representando as possíveis diferentes espécies desse gênero (Tabela 1). Adicionalmente, foram selecionados oito dentre os 16 isolados para a preservação em Liofilização e Solo com extrato. Selecionamos representantes com conídios amarelo, marrom e rosa para avaliar essas duas técnicas. Nós reduzimos o número de isolados de *Escovopsis* tendo em vista que não houve diferença entre aqueles que apresentavam a mesma coloração de conídios nos tratamentos de Castellani, Criopreservação (-80 °C) e Sílica-gel.

Os isolados mantidos no acervo foram reativados em placa de Petri contendo meio de cultivo batata-dextrose ágar (BDA), acrescidos de 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias. A partir dessa reativação foram armazenadas duplicatas de cada isolado a 8 °C, em tubos contendo BDA inclinado.

Tabela 1. Isolados de *Escovopsis* spp. utilizados nas preservações.

| CRM ¹ | LESF ² | Fungos ³ | Conídios ⁴ | Formiga de origem | Preservação ⁵ |
|------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 248 | 041 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Acromyrmex lundii</i> | L, S |
| 249 | 042 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Acromyrmex lundii</i> | |
| 259 | 052 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Trachymyrmex diversus</i> | L, S |
| 263 | 106 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Trachymyrmex dichrous</i> | |
| 558 | 303 | <i>Escovopsis kreiselii</i> | Rosa | <i>Mycetophylax morschi</i> | L, S |
| 559 | 304 | <i>Escovopsis kreiselii</i> | Rosa | <i>Mycetophylax morschi</i> | L, S |
| 577 | 324 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Atta laevigata</i> | |
| 900 | 519 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | |
| 901 | 520 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | L, S |
| 960 | 575 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Acromyrmex disciger</i> | |
| 1339 | 833 | <i>Escovopsis</i> sp. | Amarelo | <i>Mycocrepus smithii</i> | L, S |
| 1340 | 834 | <i>Escovopsis</i> sp. | Amarelo | <i>Mycocrepus smithii</i> | L, S |
| 1349 | 843 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Atta cephalotes</i> | |
| 1350 | 844 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Atta cephalotes</i> | |
| 1354 | 847 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Apterostigma</i> sp. | |
| 1355 | 848 | <i>Escovopsis</i> sp. | Marrom | <i>Apterostigma</i> sp. | L, S |

¹ CRM: código da coleção da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

² LESF: Código da coleção do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF).

³ Fungos identificados até gênero tratam-se de espécies filogenéticas novas (não descritas), descobertas em estudo prévio (MEIRELLES et al., 2015).

⁴ Os fungos estão separados no presente estudo baseado na coloração dos conídios.

⁵ Todos os isolados foram preservados em Castellani, Criopreservação -80 °C e Sílica-gel. L e S: isolados selecionados para preservação em Liofilização e Solo com Extrato, respectivamente.

4.2 Preservação das culturas

Foram empregados os métodos de preservação de Castellani, Criopreservação (-80 °C), Liofilização, Sílica-gel e Solo com extrato. Foram realizadas cinco réplicas (tubos ou *vials*) para cada método de preservação, para a realização das análises de crescimento micelial e viabilidade de conídios a cada dois meses.

4.2.1 Castellani

A preservação consistiu em retirar discos de 6 mm de diâmetro das culturas de *Escovopsis* mantidas em meio de cultivo BDA, contendo micélio e estruturas reprodutivas. Os discos foram transferidos para frascos de vidro com água destilada esterilizada, lacrados e acondicionados em câmara fria (8 °C).

4.2.2 Criopreservação (-80 °C)

Com o auxílio de uma agulha de inoculação foi retirada uma quantidade de conídios das culturas mantidas em BDA, transferindo-os para tubos criogênicos com solução de glicerol a 10% (crioprotetor) esterilizada. Os tubos foram dispostos em freezer (-20 °C) durante 20 minutos, evitando choque térmico e, em seguida, acondicionados em ultra-freezer a -80 °C.

4.2.3 Sílica-gel

A partir do método descrito por Perkins (1962), adaptado, as estruturas reprodutivas de cada isolado foram suspensas em leite desnatado (Molico[®]), esterilizado durante 15 minutos, em autoclave. Foi utilizado papel filtro esterilizado (1 cm²) para absorver os conídios. As tiras de papel foram acondicionadas em frascos de vidro contendo sílica-gel esterilizada. A sílica-gel libera calor em contato com o preservante líquido (leite desnatado), o que mantém os conídios livres de umidade, mantendo-os inativos (sem germinar). Os frascos foram lacrados e armazenados a temperatura ambiente (± 25 °C).

4.2.4 Liofilização

Para a preservação com a técnica de Liofilização, foi utilizado o crioprotetor *Skim Milk* (Difco®) na concentração de 10%. Foram utilizados cinco frascos 2R (Christ®) por isolado. O crioprotetor foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm, durante 6 minutos. A válvula da autoclave foi aberta logo em seguida ao tempo previsto de esterilização (DAY; STACEY, 2007). Para cada placa de BDA, foram utilizados 5 mL do crioprotetor. O *Skim Milk* foi transferido para as placas com as culturas com crescimento vigoroso e os conídios foram suspendidos com o auxílio de um *swab* esterilizado. Foram transferidos 400 µL dessa suspensão em cada frasco 2R, fechando até o primeiro estágio da tampa de borracha. Os tubos foram dispostos em um suporte de isopor e transferido para o Liofilizador de alta performance (Christ®, modelo Alpha 2-4 LSCplus). A programação realizada nesse equipamento foi: resfriamento até 0 °C/20 min, congelamento a -25 °C/40 min, aquecimento a -21 °C/20 min, secagem primária a 0 °C/23 h e vácuo de 0,1 mbar e secagem secundária a 25 °C/22 h vácuo de 0,005 mbar, com variações de vácuo e temperatura, conforme necessário. Após o processo de Liofilização, os frascos foram fechados a vácuo até o segundo estágio da tampa de borracha, lacrados e armazenados a 10 °C, no escuro.

4.2.5 Solo suplementado com extrato

Os fungos mutualistas foram reativados do acervo da CRM-UNESP e incubados a 25 °C, em meio BDA, durante 21 dias. Quatro discos de micélio (6 mm de diâmetro) de cada isolado foram transferidos para frascos Erlenmeyer (125 mL), contendo 40 mL de meio de cultivo caldo batata-dextrose (BD). Os frascos foram acondicionados a 25 °C, com rotação a 120 rpm, durante 14 dias. Em seguida, a filtração do meio de cultivo foi realizada a vácuo utilizando uma membrana esterilizada de 0,45 µm.

Foram utilizados 5 g de areia grossa por tubo, sendo cinco destes por isolado. O solo foi esterilizado em autoclave três vezes, a 121 °C e 1 atm, durante 1 hora cada ciclo. Adicionamos o extrato do fungo mutualista nos tubos com areia. Tendo em vista que o gênero *Escovopsis* é um micoparasita, utilizamos o extrato do fungo mutualista (hospedeiro) particular de cada isolado do parasita. Foi utilizado *Leucocoprinus* sp. (AR01), isolado da formiga *Mycetophylax morschi* para os isolados de cor amarela e rosa (basais). Para os isolados de coloração marrom (derivados) foi utilizado o fungo

mutualista *L. gongylophorus* (FF2006), isolado da formiga *Atta sexdens*. Os isolados de *Escovopsis* foram inoculados no solo e acrescidos de 700 μ L de extrato por tubo.

4.3 Reativação dos isolados pós-preservação

Os isolados foram reativados em seis placas para cada método de preservação, para realização das análises. Foram reativados em meio de cultivo BDA, a 25 °C, no escuro, com incubação de 14 dias. A reativação ocorreu a cada dois meses, durante dez meses, para todas as técnicas.

A reativação em Castellani consistiu na retirada de um disco de ágar contendo micélio do frasco e semeado no centro da placa. Para Criopreservação, o tubo foi retirado do ultra-freezer e os conídios semeados em BDA com auxílio de uma agulha de inoculação. No caso de Sílica-gel, a reativação foi realizada a partir da retirada de um papel filtro do tubo e posicionado no centro da placa de BDA. Já para Liofilização, os isolados foram reativados com a adição de 400 μ L solução salina (NaCl a 0,85%) por tubo. Após 10 minutos, o tubo foi agitado mecanicamente e 20 μ L da suspensão foram transferidos para o centro da placa de BDA. Para os isolados preservados em Solo, a reativação ocorreu com a retirada de alguns grãos de areia, com auxílio de uma alça de transferência, e semeado no centro da placa.

4.4 Avaliação dos isolados pós-preservação: controle de qualidade

4.4.1 Culturas viáveis

Com os resultados de crescimento micelial e viabilidade de conídios calculamos a porcentagem de culturas viáveis (i.e. vivas) durante o período de preservação. A presença de crescimento micelial é um item fundamental para a viabilidade de conídios, que é determinada a partir da esporulação do fungo. Os resultados de crescimento micelial foram considerados em sete dias de incubação. A viabilidade de conídios pode ser avaliada em até 14 dias de incubação. Com isso, os isolados que apresentaram crescimento micelial em sete dias e/ou esporulação em até 14 dias foram considerados como culturas viáveis. A determinação da porcentagem de culturas viáveis foi realizada com a contagem de isolados que apresentaram esses parâmetros, multiplicado por 100 e

dividido pela quantidade de isolados preservados na técnica ($CV = (FV*100) / FI$, onde CV: culturas viáveis (em %), FV: fungos vivos e FI: fungos vivos antes da preservação).

4.4.2 Avaliação do crescimento micelial

O crescimento das colônias foi registrado nos dias 0, 3, 5 e 7 após reativação, em *scanner* (HP Deskjet 2050, série J510). Após a digitalização, a área de crescimento (em cm^2) das colônias foi mensurada com o auxílio do *software* ImageJ (versão 1.48 v; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), utilizando os dados do sétimo dia de incubação.

4.4.3 Avaliação da viabilidade dos conídios

Para cada isolado, foi preparada uma suspensão de conídios em 600 μ L de Tween (0,05%). A suspensão foi homogeneizada em agitador (durante 1 min) e 100 μ L desta foram aplicados em um poço de uma placa de Elisa. Para cada isolado foi utilizado um poço da placa para avaliação. Neste poço foram adicionados 100 μ L de caldo BD. A placa foi incubada a 25 °C, no escuro. A avaliação da germinação foi realizada após 24 horas de incubação. Com auxílio de uma câmara de Neubauer, foram enumerados os conídios que apresentavam tubo germinativo, bem como aqueles que não o apresentavam. Com esses dados, foi calculada a porcentagem de viabilidade considerando o número de conídios com tubo germinativo, dividido pelo número total de conídios (germinados e não-germinados). Os isolados que não apresentaram esporulação no período de até 14 dias não foram contabilizados.

4.4.4 Avaliação da macromorfologia das colônias

As características macroscópicas das colônias de cada isolado foram avaliadas antes da preservação. Essas características também foram registradas na terceira e na quinta reativação, a partir de fotografias com câmera digital (DSCH100 - SONY®), para comparação.

4.5 Análise dos dados

Para o crescimento micelial, foi calculada a área média da colônia para cada isolado separadamente, considerando as cinco placas. Com isso, foi determinado o erro padrão da média. Adicionalmente, foi calculada a área média de crescimento considerando todos os isolados em conjunto. Tal cálculo foi realizado a fim de obter uma visão geral do crescimento dos 16 isolados para cada técnica. A viabilidade dos conídios foi calculada a partir da porcentagem média de germinação considerando todos os isolados para as diferentes técnicas.

Foram realizadas comparações par-a-par utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes (HART, 2001). Esse teste foi utilizado para verificar se existem diferenças significativas entre duas técnicas ou dois períodos diferentes para a mesma técnica. Já o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar mais de duas técnicas de preservação (MCKIGHT; NAJAB, 2010). Esse teste também foi utilizado para avaliar o crescimento de um mesmo isolado em mais de dois períodos. As análises não-paramétricas foram adotadas, pois os dados não atingiram os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância para serem aplicadas as análises paramétricas. Foi adotado o nível de significância de 5% para ambas as análises.

Foi utilizado o *software* Past v. 2.17c. (HAMMER et al., 2001) para a criação de diagramas de pontos com os dados de crescimento micelial e viabilidade de conídios. O mesmo *software* foi utilizado para gerar os demais gráficos e para realizar as análises estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 Preservação em Castellani, Criopreservação e Sílica-gel

5.1.1 Culturas viáveis

As técnicas de Criopreservação e Castellani proporcionaram um maior número de culturas viáveis de *Escovopsis* em dez meses de preservação, quando comparadas à técnica de Sílica-gel (Tabela 2). Todos os 16 isolados estavam viáveis em Criopreservação e Castellani; enquanto que em Sílica-gel, apenas 12 isolados permaneceram vivos. Entretanto, aos quatro e seis meses de armazenamento em Castellani, um tubo dos isolados não continha conídios vivos (Tabela 2). Contudo, em oito meses todos os isolados estavam viáveis.

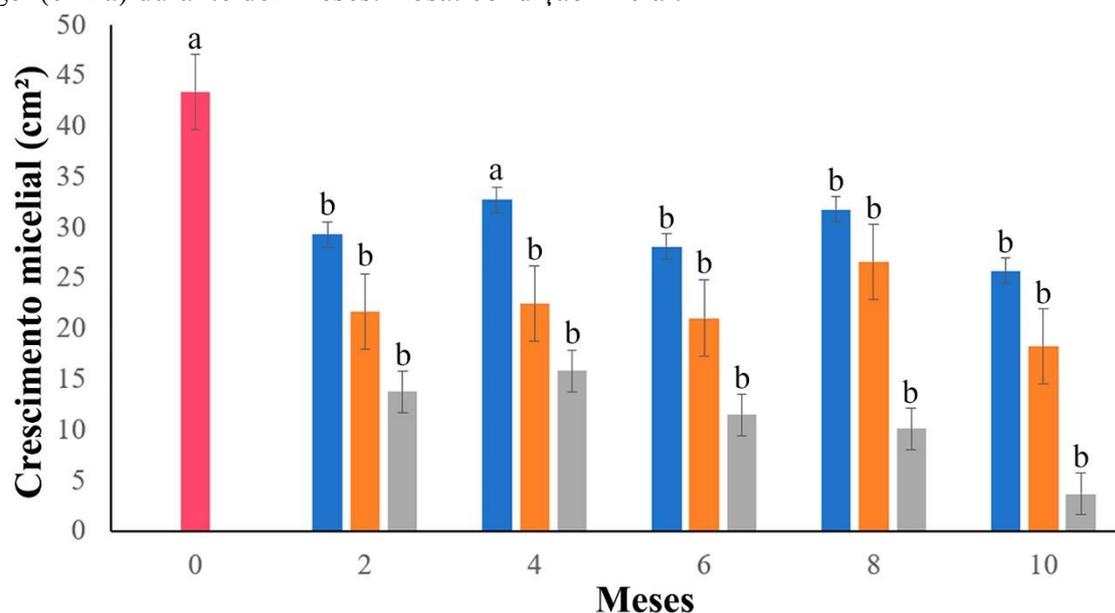
5.1.2 Crescimento micelial

Houve diferença significativa no crescimento micelial dos isolados de *Escovopsis* spp., entre o segundo e o décimo mês de preservação, pelas técnicas em Criopreservação, Castellani e Sílica-gel (Mann-Whitney, $P=0,0004$, $P=0,001$, $P=0,0001$, respectivamente). O crescimento micelial tendeu ser inversamente proporcional ao tempo de preservação dos isolados. Considerando todos os isolados em conjunto e todos os meses de reativação, a média de crescimento micelial (em cm^2) foi maior na técnica de Criopreservação, seguida pela técnica de Castellani (Figura 1). Após dez meses de preservação, os isolados apresentaram, em média, 25,7 e 18,2 cm^2 de crescimento micelial em Criopreservação e Castellani, respectivamente. Entretanto, os isolados mantidos sob a técnica de Sílica-gel apresentaram a menor média de crescimento (3,7 cm^2). Nessa técnica, também observamos a maior redução no crescimento micelial (cerca de 39,7 cm^2), quando comparado com o controle. Por outro lado, observamos uma redução de 17,7 cm^2 de crescimento micelial para os isolados preservados em Criopreservação e de 25,2 cm^2 em Castellani (Figura 1).

Tabela 2. Porcentagem de culturas de *Escovopsis* spp. viáveis após preservação nos métodos: Castellani (C), Criopreservação (G) e Sílica-gel (SG). Os números entre parênteses indicam a quantidade de isolados viáveis.

| Tempo (meses) | % de isolados viáveis | | |
|---------------|-----------------------|----------|------------|
| | C | G | SG |
| 0 | 100 (16) | 100 (16) | 100 (16) |
| 2 | 100 (16) | 100 (16) | 93,75 (15) |
| 4 | 93,75 (15) | 100 (16) | 100 (16) |
| 6 | 93,75 (15) | 100 (16) | 87,5 (14) |
| 8 | 100 (16) | 100 (16) | 100 (16) |
| 10 | 100 (16) | 100 (16) | 75 (12) |

Figura 1. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm^2) de 16 isolados de *Escovopsis* spp. preservados em: Criopreservação (azul), Castellani (laranja) e Sílica-gel (cinza) durante dez meses. Rosa: condição inicial.



* Letras distintas demonstram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as reativações e a condição inicial (0), segundo análise de Mann-Whitney.

Os isolados armazenados em Sílica-gel contaram com os menores resultados de crescimento, principalmente, em dez meses de preservação (Figura 1). O isolado LESF 042 foi o que apresentou maior crescimento na última reativação nessa técnica, com $27,7 \text{ cm}^2$. Entretanto, foi o menor crescimento entre os métodos (Castellani com $34,2 \text{ cm}^2$ e Criopreservação com $38,4 \text{ cm}^2$). O segundo maior resultado foi de LESF 844, com $13,9 \text{ cm}^2$. Neste método, o isolado apresentou crescimento micelial maior do que aquele observado em Castellani ($1,5 \text{ cm}^2$), entretanto, não mais do que o observado em Criopreservação ($35,4 \text{ cm}^2$).

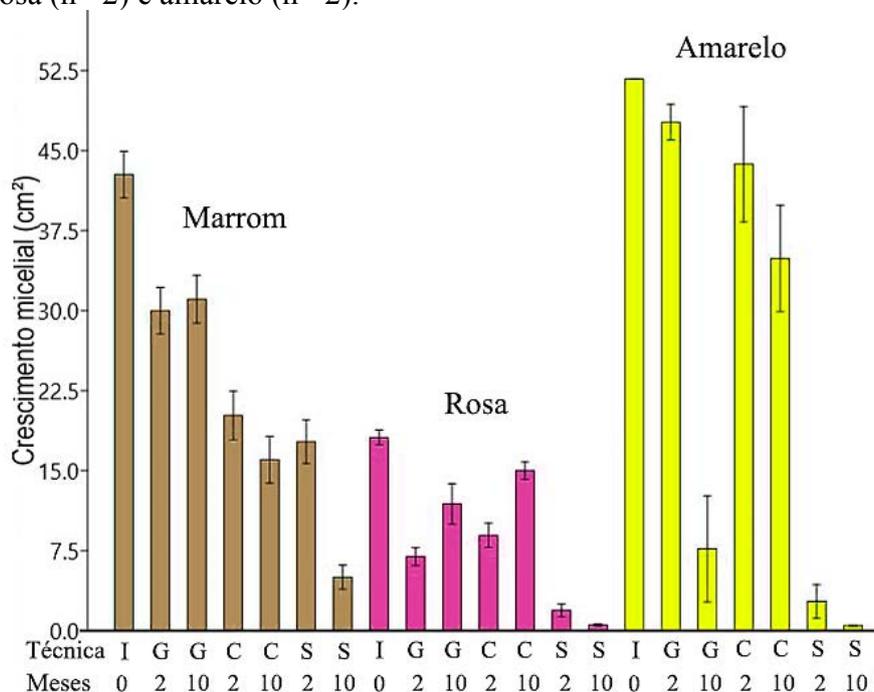
5.1.3 Viabilidade de conídios

A técnica de Criopreservação proporcionou a maior média (16%) de viabilidade dos conídios para os isolados, após dez meses de preservação, seguido de Castellani (14%) e Sílica-gel (7%). Entretanto, houve bastante variabilidade quanto a viabilidade de conídios entre os 16 isolados examinados. Considerando a média entre dois e dez meses de preservação, para os isolados preservados em Sílica-gel, houve a maior redução de viabilidade de conídios, 7,9 %, seguido de 2,1% em Criopreservação. Contudo, houve um aumento de 1,3% em Castellani. Houve diferença significativa entre a viabilidade de conídios avaliando dois e dez meses de preservação em Criopreservação (Mann-Whitney, $P=0,001$) e em Castellani (Mann-Whitney, $P=0,04$). Não houve diferença estatística para os isolados preservados em Sílica-gel, comparando o mesmo período de armazenamento (Mann-Whitney, $P=0,3$). As diferenças estatísticas entre Castellani e Criopreservação não foram significativas considerando viabilidade dos conídios (Mann-Whitney, $P=0,42$).

5.1.4 Grupos de *Escovopsis*: marrom, rosa e amarelo

Cada grupo de *Escovopsis* apresentou particularidades, respondendo de maneira distinta aos métodos de preservação. Considerando os isolados de *Escovopsis* por coloração dos conídios, o controle apresentou a maior média e variação de dados em relação ao crescimento micelial, quando comparado com as demais reativações (Figura 2).

Figura 2. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm^2) de isolados de *Escovopsis* spp. preservados em: Criopreservação (G), Castellani (C) e Sílica-gel (S) em dois e dez meses de armazenamento. Inicial (I): condição inicial respectiva a cor de conídio. As cores das barras seguem a coloração dos conídios: marrom (n= 12 isolados), rosa (n= 2) e amarelo (n= 2).



O método de Criopreservação foi mais adequado na preservação de isolados com conídios de coloração marrom. Após dez meses de preservação foi observado o crescimento micelial com média de 31 cm^2 e 15% de viabilidade para os isolados LESF 041, LESF 042, LESF 052, LESF 106, LESF 324, LESF 519, LESF 520, LESF 575, LESF 843, LESF 844, LESF 847 e LESF 848. Entretanto, Castellani foi o segundo melhor método de preservação para esses fungos. Quando preservados nessa técnica alcançaram, em média, 16 cm^2 de crescimento micelial e 12% de viabilidade de conídios. O menor resultado observado foi em Sílica-gel, com média de $5,1 \text{ cm}^2$ de crescimento e 4,2% de viabilidade (Figura 2).

Castellani foi o melhor método de preservação para isolados com coloração rosa (LESF 303 e 304). Em dez meses de preservação, os isolados apresentaram média de 15 cm^2 de crescimento micelial, seguido de $11,8 \text{ cm}^2$ para Criopreservação e $0,54 \text{ cm}^2$ para Sílica-gel. A média de viabilidade de conídios desses isolados em dez meses de preservação foi de 22,5% para Castellani, 17,5% para Criopreservação e Sílica-gel.

O método de Castellani foi mais adequado para os isolados de coloração amarela (LESF 833 e 834). Após dez meses, o crescimento micelial sob o método de Castellani foi de $34,8 \text{ cm}^2$, enquanto Criopreservação apresentou $7,65 \text{ cm}^2$ e Sílica-gel com $0,48$

cm². A média de viabilidade de conídios desses isolados, na última reativação, foi de 19,5% para Castellani, 16,5% para Criopreservação e 13% para Sílica-gel.

5.1.5 Macromorfologia

As características morfológicas sofreram alterações segundo o método e tempo de armazenamento. Os isolados LESF 041, LESF 042, LESF 052 e LESF 848 apresentaram redução na área de esporulação com o passar dos meses (Figuras 3A e 3B). Os isolados LESF 106, LESF 324 e LESF 519 contavam com esporulação maior ou igual à do controle, considerando dez meses, pelo método de Criopreservação (Figura 3A). O isolado LESF 843 apresentou colônia morfológicamente semelhante após dez meses de preservação, quando reativado de Castellani e Criopreservação (Figura 3B). Esse isolado apresentou conídios mais pigmentados nessas técnicas, quando comparado ao controle. O isolado LESF 847 apresentou maior esporulação em Castellani e Criopreservação após dez meses, quando comparado com seis meses de armazenamento (Figura 3B). Para o isolado LESF 833, em dez meses em Castellani, havia maior esporulação, quando comparado com seis meses (Figura 3B).

Fungos com coloração de conídios distintos apresentaram diferentes padrões de alterações morfológicas em relação aos métodos. Os isolados LESF 833 e LESF 834, com conídios amarelos, apresentaram um aumento de área esporulação, em reativações após dez meses de preservação em Castellani e Criopreservação (Figura 3B). Os isolados LESF 303 e LESF 304, de coloração rosa, mantiveram a esporulação ao longo do tempo, inclusive quando comparado com a reativação controle (Figura 3A). Por outro lado, os isolados de coloração marrom responderam de modos distintos durante a preservação em todas as técnicas (Figuras 3A e 3B).

Figura 3A. Características macroscópicas das colônias de oito isolados de *Escovopsis* spp. na condição inicial, após seis e dez meses de preservação em Criopreservação, Castellani e Sílica-gel.

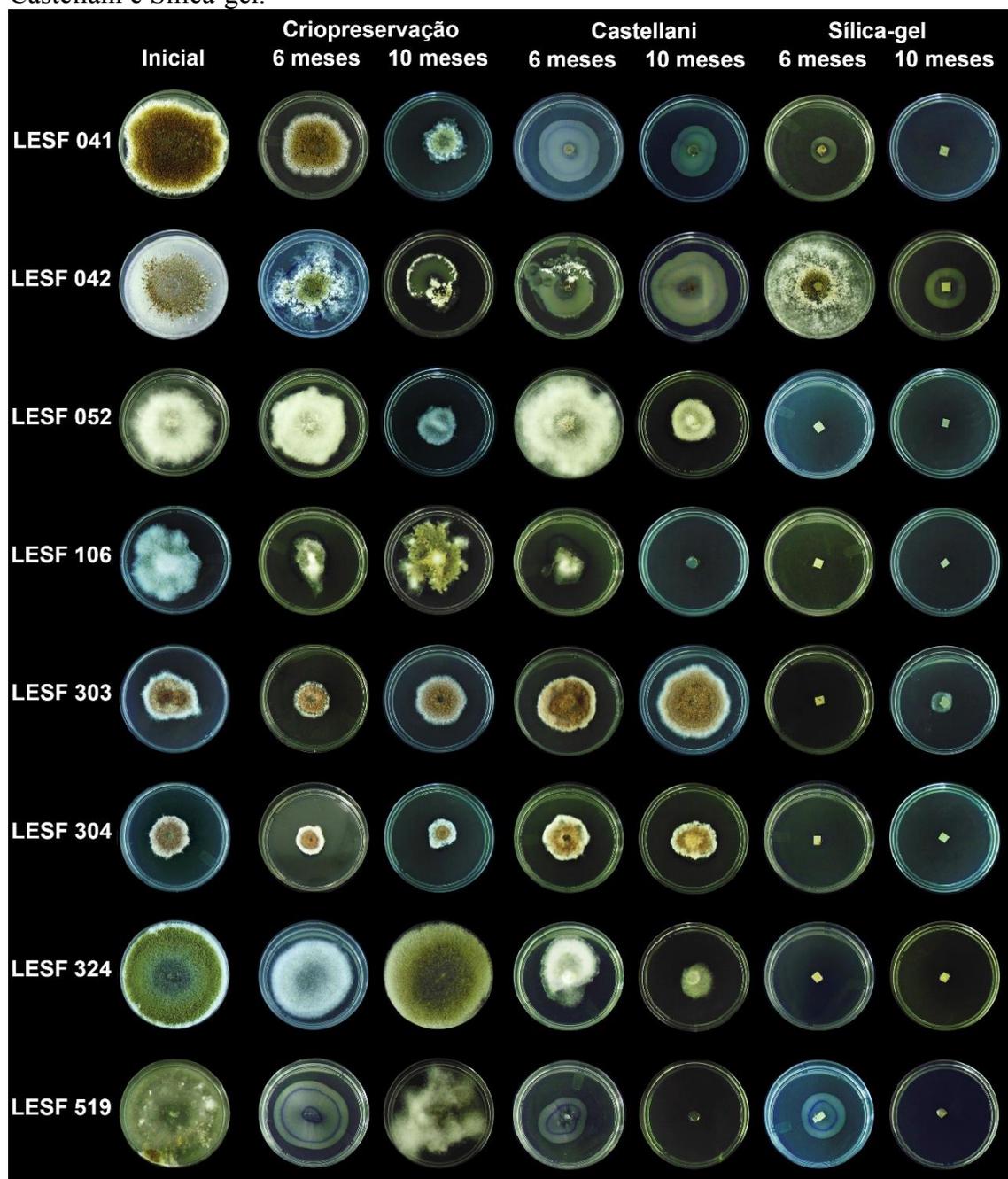
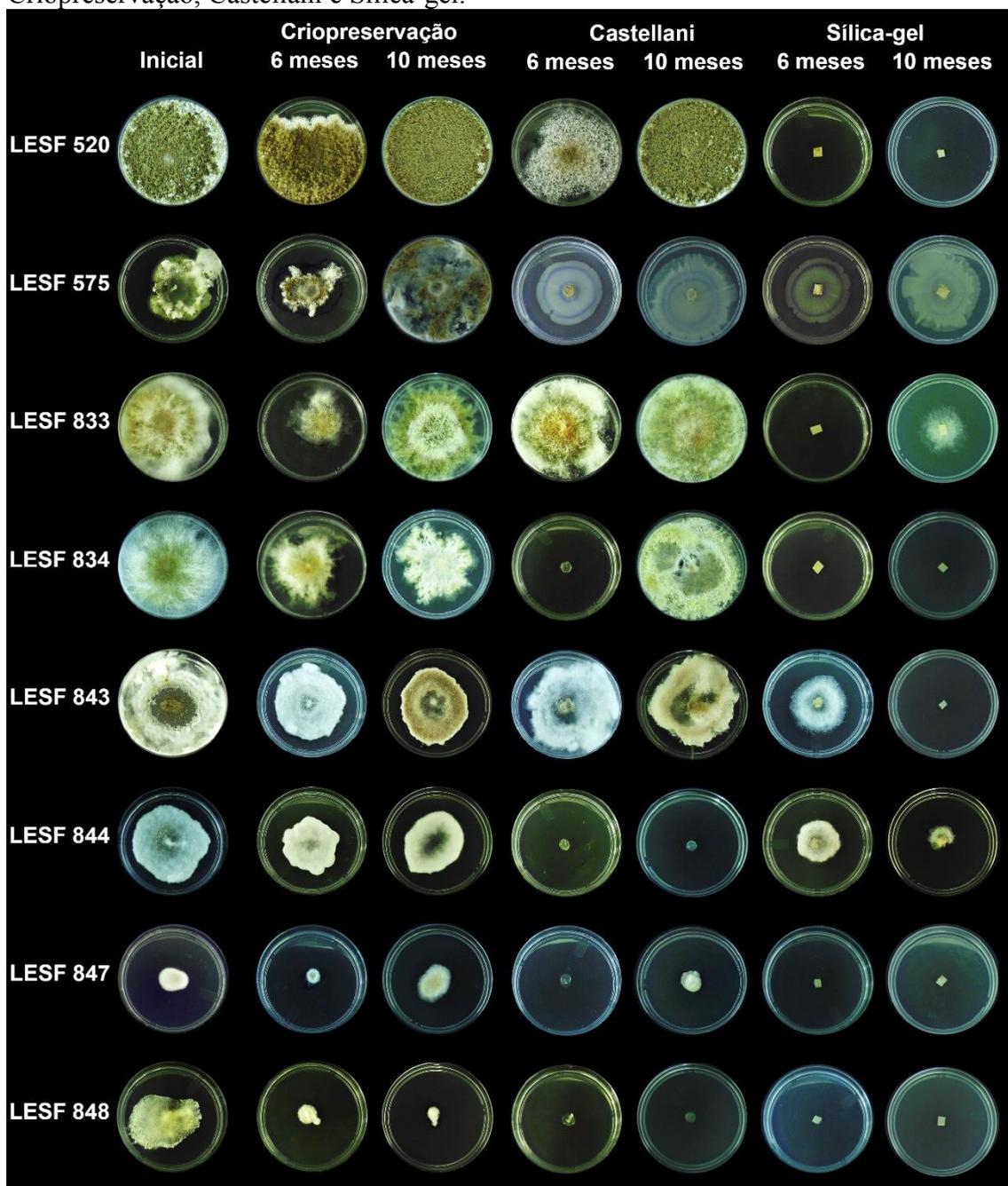


Figura 3B (continuação). Características macroscópicas das colônias de oito isolados de *Escovopsis* spp. na condição inicial, após seis e dez meses de preservação em Criopreservação, Castellani e Sílica-gel.



5.2 Liofilização e Solo com extrato

5.2.1 Culturas viáveis

A técnica de Solo com extrato foi a que proporcionou os maiores resultados de culturas viáveis de *Escovopsis* em dez meses de preservação. Dentre os isolados preservados, 71% estavam viáveis nesta técnica (Tabela 3). A preservação em Solo do

isolado LESF 052 foi excluída das análises, visto que alguns tubos estavam contaminados durante as reativações. Portanto, sete foi o número de isolados analisados. Em Liofilização, apenas 37% dos isolados se mostraram viáveis no período de dez meses.

Tabela 3. Porcentagem de culturas de *Escovopsis* spp. viáveis após preservação nos métodos: Liofilização (L) e Solo com extrato (S). Os números entre parênteses indicam a quantidade de isolados viáveis.

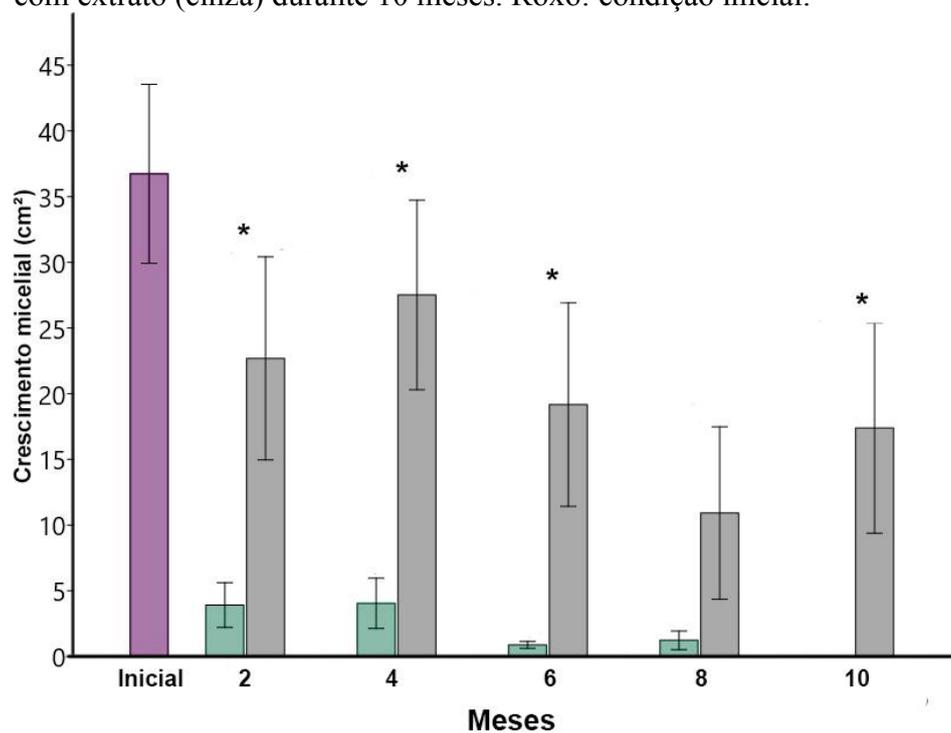
| Tempo (meses) | % de isolados viáveis | |
|---------------|-----------------------|----------|
| | L | S |
| 0 | 100 (8) | 100 (7) |
| 2 | 100 (8) | 100 (7) |
| 4 | 87,5 (7) | 100 (7) |
| 6 | 87,5 (7) | 85,7 (6) |
| 8 | 50 (4) | 42,9 (3) |
| 10 | 37,5 (3) | 71,4 (5) |

5.2.2 Crescimento micelial

Solo com extrato foi o método que proporcionou a maior média de crescimento micelial (cm²) em todas as reativações, quando comparado com a técnica de Liofilização (Figura 4). Entretanto, os isolados mantidos em ambas as técnicas apresentaram crescimento menor do que aquele atingido pelos isolados na condição inicial (controle). Para a técnica de Liofilização, houve um crescimento micelial reduzido em todos os períodos para os isolados (Figura 5A). Após dez meses de preservação, não se observou qualquer crescimento entre os isolados nesse método (Figura 5A). Comparando o crescimento entre as técnicas mensalmente, houve diferença significativa entre quase todas as reativações (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 4). No entanto, em oito meses não foram observadas diferenças estatísticas (Mann-Whitney, $P = 0,09$, Figura 4).

Em oito meses de preservação em Liofilização, apenas 4 de 8 isolados avaliados apresentaram crescimento (LESF 041, LESF 303, LESF 833 e LESF 848). O isolado LESF 303 (rosa) foi o que apresentou o maior crescimento micelial em oito meses (Tabela 4). Em seis meses, sete isolados apresentaram crescimento. Comparando o crescimento micelial entre os meses, para cada isolado, foi observada diferença significativa para a maioria dos fungos (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$, Tabela 4), com exceção dos isolados LESF 834 e LESF 848.

Figura 4. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm^2) de isolados de *Escovopsis* spp. preservados em: Liofilização (azul) e Solo com extrato (cinza) durante 10 meses. Roxo: condição inicial.



* Diferença significativa ($P < 0,05$) entre as técnicas a partir da análise estatística de Mann-Whitney, considerando o mesmo mês.

Figura 5. Crescimento micelial (em cm^2) de isolados de *Escovopsis* spp. reativados das técnicas de preservação: (A) Liofilização e (B) Solo com extrato, durante dez meses de armazenamento. 0: condição inicial, antes da preservação.

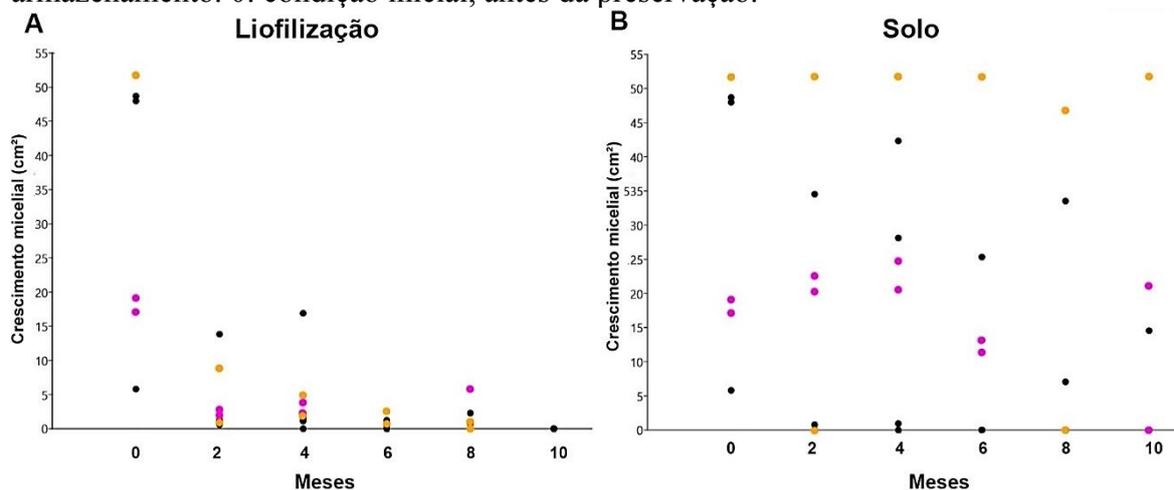


Tabela 4. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm²) de isolados de *Escovopsis* spp. preservados pelo método de Liofilização após 10 meses.

| Código | Tempo (meses) | | | | | | P |
|----------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----|----------|
| | 0* | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| LESF 041 | 47,9 \pm 0,5 | 13,8 \pm 0,7 | 16,9 \pm 1,3 | 1,2 \pm 0,1 | 2,3 \pm 0,9 | 0 | 0,004** |
| LESF 052 | 48,7 \pm 3,0 | 1,2 \pm 0,2 | 1,6 \pm 0,4 | 0,5 \pm 0,07 | 0 | 0 | 0,015** |
| LESF 520 | 51,7 \pm 0,001 | 1,2 \pm 0,2 | 1,1 \pm 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0,013** |
| LESF 848 | 5,8 \pm 1,2 | 0,6 \pm 0,03 | 0 | 0,6 \pm 0,07 | 0,7 \pm 0,08 | 0 | 0,2 |
| LESF 303 | 17,1 \pm 0,5 | 1,9 \pm 0,4 | 3,9 \pm 0,7 | 0,6 \pm 0,1 | 5,8 \pm 2,0 | 0 | 0,0008** |
| LESF 304 | 19,1 \pm 1,2 | 2,7 \pm 1,0 | 2,2 \pm 0,8 | 0,7 \pm 0,1 | 0 | 0 | 0,008** |
| LESF 833 | 51,7 \pm 0,001 | 8,8 \pm 4,7 | 4,9 \pm 2,8 | 0,8 \pm 0,08 | 1,1 \pm 0,1 | 0 | 0,04** |
| LESF 834 | 51,7 \pm 0,001 | 0,9 \pm 0,06 | 1,7 \pm 0,8 | 2,5 \pm 1,9 | 0 | 0 | 0,5 |

* Crescimento avaliado antes da preservação.

** Diferença significativa ($P < 0,05$) entre as reativações a partir da análise estatística de Kruskal-Wallis.

Os isolados com esporulação amarela (LESF 833 e LESF 834) apresentaram maior crescimento quando reativados de Solo com extrato. Isso ocorreu após dez meses de preservação. Além desses isolados, outros dois (LESF 303 e LESF 520) apresentaram crescimento micelial no mesmo período. Os isolados de esporulação rosa (LESF 303 e LESF 304) aparentam crescimento semelhante nas reativações de dois, quatro e seis meses (Figura 5B). Comparando o crescimento micelial entre os meses, para cada isolado, foi observada diferença significativa para a maioria dos fungos (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$, Tabela 5), com exceção dos isolados LESF 833 e LESF 848.

Tabela 5. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm²) de isolados de *Escovopsis* spp. preservados pelo método de Solo com extrato após 10 meses.

| Código | Tempo (meses) | | | | | | P |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|----------|
| | 0* | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| LESF 41 | 47,9 \pm 0,5 | 34,5 \pm 5,6 | 28,1 \pm 5,8 | 25,3 \pm 4,8 | 7,1 \pm 1,1 | 0 | 0,009** |
| LESF 520 | 51,7 \pm 0,001 | 51,7 \pm 0,001 | 42,3 \pm 7,5 | 51,7 \pm 0,001 | 33,5 \pm 4,3 | 14,5 \pm 2,8 | 0,009** |
| LESF 848 | 5,8 \pm 1,2 | 0,8 \pm 0,3 | 0,9 \pm 0,4 | 0 | 0 | 0 | 0,9 |
| LESF 303 | 17,1 \pm 0,5 | 20,2 \pm 1,9 | 20,5 \pm 0,4 | 11,4 \pm 2,4 | 0 | 21,1 \pm 2,7 | 0,001** |
| LESF 304 | 19,1 \pm 1,2 | 22,5 \pm 3,1 | 24,7 \pm 1,6 | 13,1 \pm 1,8 | 0 | 0 | 0,0013** |
| LESF 833 | 51,7 \pm 0,001 | 51,7 \pm 0,001 | 51,7 \pm 0,001 | 51,7 \pm 0,001 | 46,8 \pm 3,3 | 51,7 \pm 0,001 | 0,08 |
| LESF 834 | 51,7 \pm 0,001 | 0 | 51,7 \pm 0,001 | 0 | 0 | 51,7 \pm 0,001 | 0,013** |

* Crescimento avaliado antes da preservação.

** Diferença significativa ($p < 0,05$) entre as reativações a partir da análise estatística de Kruskal-Wallis.

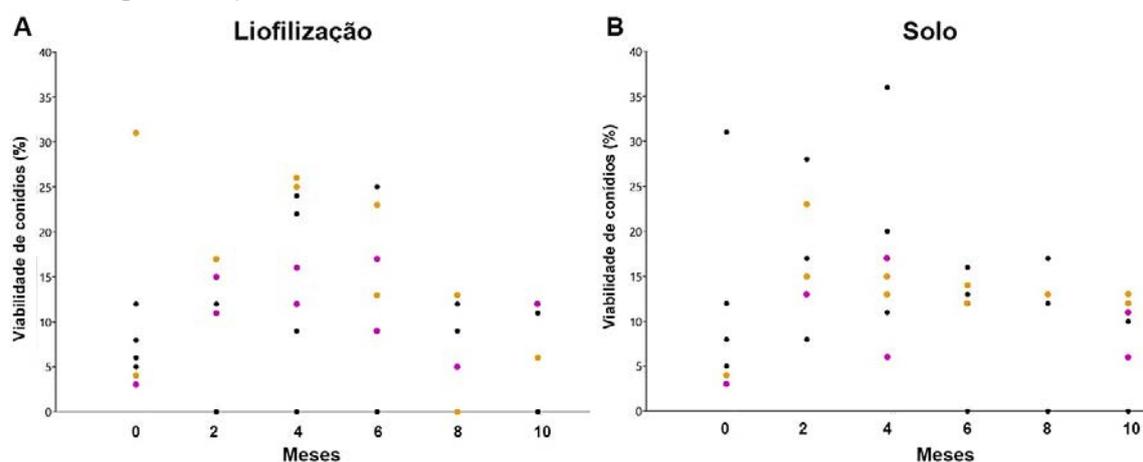
5.2.3 Viabilidade de conídios

A técnica que proporcionou maior média de viabilidade de conídios para os isolados em dez meses de preservação foi Solo com extrato (9,6%). Isolados em Liofilização apresentaram, em média, 7,2% de conídios viáveis. Foi observado uma grande variabilidade da viabilidade de conídios entre os oito isolados examinados. Entretanto, os

resultados dos isolados reativados de Liofilização e Solo apresentaram um padrão a partir do sexto mês de preservação (Figura 6). A partir de seis meses, houve uma redução de isolados com esporulação e na porcentagem de conídios viáveis. Considerando a média entre a primeira e a última avaliação para os isolados preservados em Liofilização, houve uma redução de 7% de viabilidade de conídios (Figura 6A). Ocorreu uma redução de 9% na média dos conídios viáveis dos isolados preservados em Solo entre a primeira e última reativação (Figura 6B).

Quanto a viabilidade de conídios após dez meses de preservação dos isolados em Liofilização, LESF 303 se destacou com 12%. O mesmo isolado, em dez meses de preservação apresentou viabilidade de conídios de 11% quando reativado no Solo com extrato. O isolado que apresentou maior porcentagem de conídios para a técnica de Solo em dez meses foi o LESF 834, com 13% (Figura 6).

Figura 6. Viabilidade de conídios (%) para isolados de *Escovopsis* spp. reativados das técnicas de preservação: (A) Liofilização e (B) Solo com extrato. 0: Condição inicial, antes da preservação.



6 DISCUSSÃO

A preservação de fungos do gênero *Escovopsis* é fundamental para a continuidade dos estudos taxonômicos e aplicados com esse micro-organismo. As técnicas de Criopreservação, Castellani e Solo com extrato apresentaram os melhores resultados para os diferentes isolados de *Escovopsis* spp., em dez meses de preservação.

O método de Criopreservação é adequado em termos de viabilidade para a maioria dos micro-organismos (BERNER; VIERNSTEIN, 2006). Geralmente, as culturas criopreservadas tendem a permanecer estáveis durante longos períodos, devido ao metabolismo reduzido (SMITH; RYAN, 2003). A baixa temperatura protege as proteínas e o DNA de possíveis danos e reduz o movimento de água na célula, interrompendo as atividades fisiológicas e bioquímicas (PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013). Além disso, o uso de um crioprotetor é essencial nessa técnica. No caso, o glicerol 10% tem como objetivo a redução do estresse causado pelo congelamento e degelo das células, protegendo-as durante o período de preservação e armazenamento (HAN et al., 2009). O aumento da concentração de glicerol pode ser uma alternativa de aperfeiçoar a eficiência do método para alguns micro-organismos. No presente estudo, utilizamos glicerol a 10%, portanto, é possível que *Escovopsis* responda melhor em concentrações maiores de glicerol. Sugere-se que, em estudos futuros, leve-se em consideração o uso de diferentes concentrações do crioprotetor.

A técnica de Castellani proporcionou resultados semelhantes do que a técnica de Criopreservação, pois em água destilada, todos os 16 isolados permaneceram vivos, após dez meses de armazenamento. A presença de água em temperaturas de cerca de 8 °C, mantém o metabolismo reduzido. Burdsall, Harold e Dorworth (1994) observaram que o tempo de armazenamento e o crescimento lento na água aumentam a estabilidade genética. Entretanto, a viabilidade depende do micro-organismo a ser preservado (BORMAN et al., 2006). Alguns isolados apresentam dificuldades para sobreviverem em longo prazo em água destilada (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992). Entretanto, não foi o que observamos.

Sílica-gel não foi um método adequado para a maioria dos isolados. A baixa eficácia pode ser devida a: (i) problemas com o preservante: na ocasião da esterilização do leite desnatado, houve a precipitação de grânulos de açúcar, devido o tempo na autoclave. Em temperaturas elevadas, os cristais da lactose sofrem a perda de água acarretando na caramelização do leite (VEISSEYRE, 1988); (ii) o aquecimento da sílica-gel no momento

da adição do papel de filtro, contendo conídios e leite desnatado. Quando a sílica entra em contato com líquidos, essa libera calor (SOUSA et al., 2017) e as temperaturas elevadas podem ter danificado os conídios; e (iii) a sílica-gel utilizada nesse trabalho não foi a mais adequada, pois apresenta um corante azul como indicador de umidade. Quando esse indicador modifica a coloração para rosa, pode se tornar tóxico para os fungos (PERKINS, 1962).

O tempo de preservação foi inversamente proporcional à viabilidade dos isolados, como é o caso para a maioria dos fungos. O gênero *Escovopsis* produz um número elevado de conídios, porém, poucos são viáveis (RODRIGUES et al., 2008). Entretanto, os valores de viabilidade encontrados no presente estudo são superiores aos relatados por Rodrigues et al. (2008). Isso sugere que esse grupo de fungos apresenta uma grande variabilidade na viabilidade dos conídios. Segundo Augustin et al. (2017), o crescimento lento de *Escovopsis* pode ser uma estratégia para colonizar as colônias das formigas atíneas, o que pode justificar a baixa viabilidade dos conídios desse gênero. Em todas as técnicas os isolados apresentaram redução de viabilidade durante o armazenamento. Os isolados que apresentaram essa redução podem ter sofrido ação do método e da temperatura de armazenamento, que pode não ter sido a ideal para o micro-organismo. Possivelmente, esses fatores retardaram também o crescimento. Condições desfavoráveis de armazenamento podem impactar negativamente na velocidade da germinação e no vigor dos conídios (LOPES et al., 2013; BARRETO et al., 2016).

Independentemente do método, os isolados apresentaram alterações nas características morfológicas das colônias, quando comparados com a condição inicial. Esses efeitos foram diferentes para cada isolado. Tal fato demonstra que é necessária a busca por outros métodos de preservação que minimizem o impacto na morfologia das culturas de *Escovopsis*.

As diferenças entre os resultados de viabilidade de conídios e crescimento micelial, após dez meses e a condição inicial, podem ser devido às características particulares dos isolados com coloração marrom, rosa e amarela. Esses se distinguem fenotipicamente pela coloração dos conídios e formação de uma vesícula no conidióforo. As vesículas são estruturas que sustentam as células que dão origem aos conídios (MEIRELLES et al., 2015). Segundo esses autores, isolados com coloração rosa e amarela não apresentam essas estruturas, enquanto aqueles com conídios marrons a possuem. A presença de uma vesícula pode ser um fator que influencie na determinação do método de preservação. *Escovopsis kreiselii* (LESF 303 e LESF 304), com conídios de coloração rosa, apresenta

preferências térmicas mais baixas e é sensível a temperaturas mais altas, quando comparado com as demais espécies de *Escovopsis* (MEIRELLES et al., 2015). Por ser mais sensível, o método de Castellani pode ter favorecido a preservação, tendo em vista que em Criopreservação a temperatura atinge $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os isolados com conídios amarelos também não apresentam vesículas, fato que pode estar associado aos resultados semelhantes observados para a espécie de coloração rosa. Os isolados de coloração marrom apresentam conídios mais pigmentados, de parede espessa e com ornamentações (AUGUSTIN et al., 2017). Possivelmente esses conídios apresentam mais melanina como pigmento, do que isolados de cor rosa e amarelo. A melanina protege a célula contra extremos ambientais, como de temperatura (ROSAS; CASADEVALL, 1997). Segundo os autores, células que possuem melanina tem proteção mais eficiente do que em células não-melanizadas. Talvez essas características estejam relacionadas com a maior sobrevivência desses fungos, favorecendo sua resistência à técnica de Criopreservação.

Avaliando as técnicas adicionais para oito isolados, constatamos que a preservação em Solo com extrato foi a mais adequada, quando comparada à técnica de Liofilização, para os isolados de *Escovopsis* spp. no período estudado. Os isolados apresentaram maior crescimento micelial e viabilidade de conídios na técnica de Solo. O método de Liofilização resultou em isolados com viabilidade de conídios, porém, proporcionou um crescimento mais lento durante as reativações. Tal crescimento pode ser devido ao estresse causado pelo processo de preservação, que pode ter causado injúria aos conídios. A “lioinjúria” é causada durante o estágio de resfriamento e de sublimação (TAN, 1997) e esses processos podem ocasionar danos genéticos às células (SMITH; RYAN, 2003). A técnica pode ser ideal para manter os isolados viáveis, entretanto, demanda um maior período de incubação durante a reativação, para que ocorra a “quebra” da dormência do conídio. Observamos o crescimento dos isolados, contudo, foi necessário mais tempo para o conídio germinar e conseqüentemente a colônia esporular. A viabilidade de conídios se manteve alta, pois a realização da avaliação ocorre a partir da placa que já apresentava o isolado esporulando.

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa indicam que o aumento da concentração do crioprotetor (*Skim Milk*) pode otimizar a técnica em longo prazo para *Escovopsis*. A liofilização é um processo que pode ter efeitos colaterais indesejáveis como a desnaturação de algumas proteínas (CARPENTER; CROWE; CROWE, 1987). Com a utilização de crioprotetores, como o *Skim Milk*, há a prevenção da possibilidade de efeitos adversos do processo (SIMIONE; BROWN, 1991). Quando

adicionados, os dissacarídeos contidos no *Skim Milk* apresentam a capacidade de estabilizar as proteínas durante a secagem, evitando a desnaturação (CARPENTER; CROWE, 1989; CROWE et al., 1988). O crioprotetor utilizado é constituído de lactose e induz uma viscosidade dentro e em torno do micro-organismo, reduzindo a mobilidade molecular e protegendo as células (MORGAN et al., 2006). De acordo com Smith e Ryan (2003), alguns isolados de Ascomycota, Mucoromycota e Basidiomycota sobreviveram em Liofilização durante mais de 30 anos. Costa et al. (2009) citam que fungos podem ser preservados cerca de 17 a 20 anos nesta técnica.

A adição do extrato do fungo mutualista na técnica de Solo pode ter favorecido a preservação de *Escovopsis* spp. Estudos preliminares indicaram que a técnica de solo sem o extrato fúngico não seria adequada para *Escovopsis*. No entanto, essa técnica é empregada para fungos de solo e de importância para a agricultura, como *Rhizoctonia* (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991) e *Septoria* (SHEARER; ZADOKS, 1974). *Escovopsis* é um micoparasita (REYNOLDS; CURRIE, 2004) e possivelmente a presença do filtrado do cultivo de seu hospedeiro, na preservação com solo, proporciona uma maior viabilidade e crescimento aos isolados. A presença dos metabólitos advindos do hospedeiro pode ter induzido o fungo ao crescimento no tubo de preservação. Augustin et al. (2017) confirmam a existência de dormência em conídios de *Escovopsis*, a qual é quebrada na presença do fungo mutualista, possivelmente revelando uma adaptação de *Escovopsis* na interação com o hospedeiro.

O isolado LESF 848, proveniente de uma colônia de *Apterostigma* sp. (uma formiga atínea basal), ocupa uma posição intermediária na filogenia de *Escovopsis* (Quimi Vidaurre Montoya, comunicação pessoal, 2018). Como o nosso acervo não apresenta o fungo cultivado por essa formiga, utilizamos o extrato de cultivo de *L. gongylophorus*, o qual é cultivado por uma formiga atínea derivada. Esse pode ser o motivo que influenciou na redução de viabilidade e de crescimento entre as reativações, o que pode inviabilizar a preservação em longo prazo desse isolado. Se o filtrado do fungo mutualista correspondente a esse isolado de *Escovopsis* for empregado, é possível que acarrete em melhores resultados na preservação.

A variação no número de culturas viáveis durante os meses (Tabela 2 e 3) pode estar associada ao uso de tubos diferentes a cada reativação. O esperado é que tubos diferentes de um mesmo fungo, preservados pelo mesmo método, apresentem viabilidades semelhantes. Entretanto, este não foi o caso observado no estudo. É possível que tal variação entre tubos de um mesmo fungo esteja relacionada ao fato de não

padronizar a porção de conídios inicial empregada na preservação, de modo que cada tubo recebeu quantidade de conídios viáveis. O mesmo ocorreu com os fungos preservados pela técnica de Solo com o extrato do fungo mutualista.

7 CONSIDERAÇÕES

O estudo demonstrou que a escolha do método de preservação é essencial para a manutenção de culturas viáveis de *Escovopsis* em longo prazo. Aparentemente, Criopreservação, Castellani e Solo com extrato são técnicas adequadas. Entretanto, adequações são necessárias visando otimizar os métodos, principalmente o aumento da concentração dos agentes preservantes, visando uma otimização dos métodos para a maioria dos isolados.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. A. et al. Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 45, n. 1, p. 21-32, 2010.
- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2004.
- AGUIAR, T. D. F. et al. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 80-93, 2012.
- ATKINSON, R. G. Quantitative studies on the survival of fungi in five-year-old dried soil cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 32, n. 5, p. 673-678, 1954.
- AUGUSTIN, J. O. et al. Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. **Royal Society Open Science**, London, v. 4, n. 5, p. 161013, 2017.
- BAKERSPIGEL, A. Soil as a storage medium for fungi. **Mycologia**, Lawrence, v. 45, n. 4, p. 596-604, 1953.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, E. R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, Dordrecht, v.10, n. 1, p. 49-62, 2009.
- BARRATT, R. W.; JOHNSON, G. B.; OGATA, W. N. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Austin, v. 52, n. 1, p. 233, 1965.
- BARRETO, L. P. et al. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* on tick cuticle and artificial medium. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 138, p. 94-103, 2016.
- BERNER, D.; VIERNSTEIN, H. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. **Scientia Pharmaceutica**, Switzerland, v. 74, n. 3, p. 137-150, 2006.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BORMAN, A. M. et al. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, n. 6, p. 361-368, 2006.
- BOOTH, C. et al. **The genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971. 237 pp.
- BROCKBANK, K. G. M.; COVAULT, J. C.; TAYLOR, M. J. Cryobiology and Cryopreservation. In: **Guide Cryopreservation**. Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, p. 1-9, 2007. 32 pp. Disponível em: <<https://goo.gl/cRA5oh>>. Acesso em: 22 de setembro de 2018.
- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.
- BUNSE, T.; STEIGLEDER, G. K. The preservation of fungal cultures by lyophilization. **Mycoses**, Berlin, v. 34, n. 3-4, p. 173-176, 1991.
- BURDSALL, J. R.; HAROLD, H.; DORWORTH, E. B. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. **Mycologia**, Lawrence, v. 86, n. 2, p. 275-280, 1994.

- CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, New York, v. 28, n. 9, p. 3916-3922, 1989.
- CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M.; CROWE, J. H. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 923, n. 1, p. 109-115, 1987.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 42, p. 225-226, 1939.
- COSTA, E. C. **Conservação de amostras do vírus da raiva mediante diferentes protocolos de Criopreservação**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010. 115 pp.
- COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p. 111-122, 2009.
- CROWE, J. H. et al. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 947, n. 2, p. 367-384, 1988.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Chennai, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001.
- CURRIE, C. R. et al. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 46-52, 2000.
- DAY, J. G.; STACEY, G. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Humana Press, Totowa, 2. ed., v. 368, 2007. 347 pp.
- DE ABREU, J. M.; DELABIE, J. H. C. Controle das formigas cortadeiras em plantios de cacau. **Revista Theobroma**, Cruzeiro, v. 16, n. 4, p. 199-211, 1986.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, Chichester, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2014.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. CRC Press, Boca Raton, 2. ed. 1995. 434 pp.
- DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Fungi preservation in distilled water. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 6, p. 591-594, 2005.
- FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, New York, v. 60, n. 3, p. S45-S53, 2010.
- FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, New York, v. 23, n. 1, p. 1-13, 1986.
- FENNELL, D. I. Conservation of fungous cultures. **The Botanical Review**, New York, v. 26, n. 1, p. 79-141, 1960.
- FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 73-82, 2001.

- FOLGARAIT, P. et al. Preliminary *in vitro* insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 250, 2011.
- GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, n. 1, p. 88, 2006.
- GREENE, H. C.; FRED, E. B. Maintenance of vigorous mold stock cultures. **Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, v. 26, n. 12, p. 1297-1299, 1934.
- GRIVELL, A. R.; JACKSON, J. F. Microbial culture preservation with silica gel. **Microbiology**, New York, v. 58, n. 3, p. 423-425, 1969.
- HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 1, n. 4, 2001. 9pp.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, New York, v. 29, n. 1, p. 26-38, 1992.
- HAN, X. et al. Measurement of the apparent diffusivity of ethylene glycol in mouse ovaries through rapid MRI and theoretical investigation of cryoprotectant perfusion procedures. **Cryobiology**, New York, v. 58, n. 3, p. 298-302, 2009.
- HART, A. Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. **BMJ: British Medical Journal**, Preston, v. 323, n. 7309, p. 391, 2001.
- HOMOLKA, L. Preservation of live cultures of basidiomycetes-recent methods. **Fungal Biology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 107-125, 2014.
- HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.
- KARABIÇAK, N.; KARATUNA, O.; AKYAR, I. Evaluation of the Viabilities and Stabilities of Pathogenic Mold and Yeast Species Using Three Different Preservation Methods Over a 12-Year Period Along with a Review of Published Reports. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 181, n. 5-6, p. 415-424, 2016.
- KEITH, S. C. Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water. **Science**, Washington, v. 37, n. 962, p. 877-879, 1913.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Medical mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 504-504, 1992.
- LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. American Society for Microbiology, Washington, v. 196, 1987. 409 pp.
- LOPES, R. B. et al. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 112, n. 3, p. 236-242, 2013.
- MAYNE, R. Y.; BENNETT, J. W.; TALLANT, J. Instability of an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus parasiticus*. **Mycologia**, Lawrence, v. 63, n. 3, p. 644-648, 1971.
- MCKIGHT, P. E.; NAJAB, J. Kruskal-Wallis Test. **Corsini Encyclopedia of Psychology**, Hoboken, p. 1, 2010.
- MEIRELLES, L. A. et al. Shared *Escovopsis* parasites between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher attine fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**, London, v. 2, n. 9, p. 150257, 2015.
- MIZRAHI, A.; MILLER, G. Long-term preservation of a nonsporulating strain of *Claviceps paspali*. **Applied microbiology**, Washington, v. 16, n. 7, p. 1100, 1968.

- MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.
- MUELLER, U. G. et al. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.
- NUZUM, C. A simple method for the preservation of some non-sporing fungi. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 104-105, 1989.
- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **MultiCiência: construindo a história dos produtos naturais**, Campinas, n. 7, 2006. 19 pp.
- ONIONS, A. H. S. Preservation of fungi. In: SMITH J. E.; BERRY, D. R.; KRISTIANSEN, B. **The Filamentous Fungi: Fungal Technology**. Edward Arnold, London, v. 4, p. 373-390, 1983. 401 pp.
- ONIONS, A. H. S. Preservation of fungi. In: BOOTH, C. **Methods in Microbiology**. Academic Press, London, v. 4, p. 113-151, 1971. 794 pp.
- PALACIO, A. et al. Viability of Basidiomycete fungal strains under different conservation methods: cryopreservation vs. freeze-drying processes. **Actualidades Biológicas**, Medellín, v. 36, n. 100, p. 13-21, 2014.
- PAOLI, P. Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstica e pesquisa. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 897-910, 2005.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- PERKINS, D. D. Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica gel. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 8, n. 4, p. 591-594, 1962.
- PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y. S. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 339, n. 1, p. 1-9, 2013.
- QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, Porto Alegre, 2005. 512 pp.
- REINECKE, P.; FOKKEMA, N. J. *Pseudocercospora herpotrichoides*: storage and mass production of conidia. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 72, n. 2, p. 329-331, 1979.
- REUSSER, F. Stability and Degeneration of Microbial Cultures on Repeated Transfer. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 5, p. 189, 1963.
- REYNOLDS, H. T.; CURRIE C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, Lawrence, v. 6, n. 5, p. 955-959, 2004.
- RODRIGUES, A. et al. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008.
- RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 159-165, 1992.

- ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 153, n. 2, p. 265-272, 1997.
- RYAN, M. J.; SMITH, D.; JEFFRIES, P. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 16, n. 2, p. 183-186, 2000.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.
- SHEARER, B. L.; ZADOKS, J. C. The latent period of *Septoria nodorum* in wheat. 2. The effect of temperature and moisture under field conditions. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 80, n. 2, p. 48-60, 1974.
- SHEARER, B. L.; ZEYEN, R. J.; OOKA, J. J. Storage and behavior in soil of *Septoria* spp. isolated from cereals. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 163-167, 1974.
- SIMIONE, F. P.; BROWN, E. M. **ATCC preservation methods: freezing and freeze-drying**. American Type Culture Collection, Rockville, 2 ed., 1991. 42 pp.
- SMITH, D.; RYAN, M. J. Current status of fungal collections and their role in biotechnology. In: **Handbook of Fungal Biotechnology**. Marcel Dekker Published, New York, v. 271, p. 527-538, 2003.
- SMITH, D. Long-term preservation of test strains (fungus). **International biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 31, n. 3, p. 227-230, 1993.
- SMITH, D.; RYAN, M. J.; DAY, J. G. **The UK National Culture Collection (UKNCC) biological resource: properties, maintenance and management**. UKNCC, Surrey, 2001. 382 pp.
- SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of Rhizoctonia species**. APS Press, Minnesota, 1991. 133 pp.
- SOUSA, B. R. et al. Técnicas de obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas. **Journal of Medicine and Health Promotion**, Belo Horizonte, v. 2, n. 3, p. 827-842, 2017.
- TAN, C. S. Preservation of fungi. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 18, p. 157-163, 1997.
- VARANDA-HAIFIG, S. S. et al. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 110, n. 4, p. 593-605, 2017.
- VEISSEYRE, R. Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. **Acribia**, Zaragoza. 1980.
- WEBER, N. A. **Gardening ants: the attines**. American Philosophical Society, Philadelphia, 1972.
- WINDELS, C. E.; BURNES, P. M.; KOMMEDAHL, T. *Fusarium* species stored on silica gel and soil for ten years. **Mycologia**, Lawrence, v. 85, n. 1, p. 21-23, 1993.

Rio Claro, 11 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. André Rodrigues
- Orientador -

Luciana Simão Carneiro
- Discente -

Dr^a. Lorena Tigre Lacerda
- Co-orientadora -