

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO
LABORATÓRIO DE MICOLOGIA, NA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, DURANTE
O SEGUNDO SEMESTRE DE 2023**

Letícia Sobrinho Nunes

MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Brasília-DF
Dezembro/2023

Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV

Relatório de estágio das atividades desenvolvidas no laboratório de Micologia, na Universidade de Brasília, durante o segundo semestre de 2023.

Letícia Sobrinho Nunes

Matrícula: 19/0043393

Orientador: Prof. Danilo Batista Pinho

Matrícula: 1084216

Trabalho de conclusão de curso, submetido à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA:

Professor Dr. Danilo Batista Pinho
Universidade de Brasília – UnB
Orientador

Clemildo de Sousa Queiroz Júnior
Engenheiro Agrônomo
Mestrando em Fitopatologia - UnB

Prof. Willie Anderson dos Santos Vieira
Universidade de Brasília – UnB

FICHA CATALOGRÁFICA

Nunes, Letícia Sobrinho.

Relatório de estágio das atividades desenvolvidas no laboratório de Micologia, na Universidade de Brasília, durante o segundo semestre de 2023 / Letícia Sobrinho Nunes; orientador Danilo Pinho. - Brasília, 2023.

32f.

Monografia (Graduação - Agronomia) – Universidade de Brasília, 2023.

1. Laboratório. 2. Fungo. 3. Micro-organismos 4. Fitopatologia 5. Treinamento I. Pinho, Danilo, orient. II. Título

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

NUNES, L.S. **Relatório de estágio das atividades desenvolvidas no laboratório de Micologia, na Universidade de Brasília, durante o segundo semestre de 2023. 32f.** Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2023.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: Letícia Sobrinho Nunes

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Relatório de estágio das atividades desenvolvidas no laboratório de Micologia, na Universidade de Brasília, durante o segundo semestre de 2023

Grau: 3° **Ano:** 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Letícia Sobrinho Nunes
Matrícula: 19/0043393

À minha família amada, cujo apoio incansável e amor constante foram pilares essenciais em cada passo da minha jornada acadêmica. Aos amigos, companheiros nos momentos alegres e conforto nos dias difíceis. E em memória do meu querido avô, cuja serenidade e afeto continuam me inspirando, mesmo na ausência física. Este trabalho é dedicado a vocês, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus pelo presente da vida, pela saúde e por todas as pessoas que Ele providenciou ao longo da minha graduação, contribuindo para o sucesso da conclusão desta etapa.

Aos meus amados avós, Rosário, Humberto, Maria das Graças e Venceslau, responsáveis por boa parte da minha criação e com cuidados e orientações que foram fundamentais para minha formação pessoal e acadêmica. Vocês foram e continuam sendo essenciais na minha vida. Espero poder dividir muito mais momentos felizes como esse com vocês.

Aos meus pais, Janaína e Ronaldo, que constantemente me apoiam e sempre confiam em mim até mais do que eu mesma. Agradeço por terem me transmitido a importância da disciplina, do esforço e da dedicação. Vocês são minha fonte de inspiração e motivação para buscar sempre o melhor.

À minha família em geral, com um destaque especial para minhas tias e irmãos, por estarem comigo em todos os momentos. Tudo foi mais leve ao longo desses anos graças aos momentos descontraídos que tivemos juntos, apoio em momentos mais difíceis, além do carinho e o estímulo de vocês que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Às minhas amigas de graduação e parceiras de vida, Geovanna Lívio e Maria Luísa Damaceno, palavras não são suficientes para expressar toda minha gratidão e amor por tudo que compartilhamos ao longo desses anos. Sem vocês nada disso seria possível. E isso é só o começo. Tenho certeza que continuaremos apoiando e celebrando as conquistas uma da outra, onde quer que estejamos.

Aos meus companheiros de curso e estágios, sou muito grata pelo companheirismo ao longo desses anos, em especial ao Guilherme Amaral e José Alan que compartilharam grande parte dessa jornada comigo. O que começou como uma relação entre colegas de turma se transformou em uma amizade que vai além da graduação. Espero conquistar e partilhar mais momentos tão significativos como esse ao lado de vocês.

Aos meus orientadores e supervisores de diferentes estágios, Tiago Lohmann, Léia Fávoro e Danilo Pinho, serei eternamente grata. Cada um contribuiu de maneira singular para o meu crescimento, tanto pessoal quanto profissional.

Obrigada por investirem tempo e conhecimento no meu desenvolvimento pessoal e profissional, contribuindo de forma tão significativa para essa etapa tão importante da minha vida. Suas orientações e exemplos continuam me inspirando e preparando para desafios futuros.

Aos professores e colaboradores da Universidade de Brasília (UnB), sou muito grata por terem sido tão presentes nos meus anos de curso e por terem contribuído de diversas maneiras para a elaboração desse trabalho. Suas orientações, aulas e compartilhamento de experiências não apenas ampliaram meu conhecimento, mas também foram fundamentais para meu amadurecimento acadêmico e pessoal.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Visualização aérea do Instituto de Biologia | 10 |
| Figura 2 - A) Incubadora; B) Bancada com equipamentos..... | 12 |
| Figura 3 - A) Bancada com equipamentos; B) Microscópio de luz Leica..... | 12 |
| Figura 4 - Placas de Petri com meio BDA solidificando..... | 14 |
| Figura 5 - Reativação de fungos em meio BDA | 15 |
| Figura 6 - A) Tubos com água destilada esterilizada (método Castellani); B) Criotubos com glicerol 10% (método de ultracongelamento)..... | 16 |
| Figura 7 - Repique de fungos em meio de cultura..... | 17 |

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVO | 2 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 3.1 O Reino Fungi | 3 |
| 3.1.1 Fungos filamentosos | 4 |
| 3.2 Atividades realizadas no laboratório | 5 |
| 3.2.1 Manipulação de fungos em uma câmara de fluxo laminar | 5 |
| 3.2.2 Desinfetantes líquidos | 6 |
| 3.2.3 Autoclave | 6 |
| 3.2.4 Meios de cultura | 7 |
| 3.3 Isolamento, purificação e preservação de fungos | 7 |
| 3.3.1 Isolamento | 7 |
| 3.3.2 Purificação | 8 |
| 3.3.3 Preservação | 8 |
| 3.3.3.1 Método Castellani | 8 |
| 3.3.3.2 Método de ultracongelamento | 9 |
| 3.3.4 Repicagem | 9 |
| 4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO | 10 |
| 4.1. Caracterização da região e o local de desenvolvimento do estágio | 10 |
| 5. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO | 11 |
| 5.1 Infraestrutura do laboratório | 11 |
| 5.2 Linha de pesquisa do laboratório | 12 |
| 6. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO | 14 |
| 6.1 Preparação de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) | 14 |
| 6.2 Vertimento de meio | 14 |
| 6.3 Reativação de fungos | 15 |
| 6.4 Preservação de fungos | 15 |
| 6.5 Repicagem de culturas fúngicas | 16 |
| 7. ÁREA DE IDENTIFICAÇÃO DO CURSO E ANÁLISE CRÍTICA | 18 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 19 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 20 |

NUNES, L.S. **Relatório de estágio das atividades desenvolvidas no laboratório de Micologia, na Universidade de Brasília, durante o segundo semestre de 2023.** 32f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2023.

RESUMO

O estágio supervisionado foi conduzido no laboratório de Micologia da Universidade de Brasília, no Instituto de Ciências Biológicas, e abrange uma variedade de atividades práticas e teóricas centradas no estudo de micro-organismos benéficos e prejudiciais aos cultivos agrícolas. Este trabalho delinea o processo detalhado envolvido na preparação de meios de cultura, na esterilização de equipamentos e meios, bem como nas etapas de isolamento, purificação e preservação de fungos. O propósito fundamental do estágio foi a integração das práticas laboratoriais com os conhecimentos adquiridos em sala de aula. Além disso, buscou-se aprimorar habilidades na gestão de pessoas, reconhecendo que em todas as esferas profissionais, as relações humanas desempenham um papel crucial no bom desempenho e desenvolvimento de atividades produtivas e eficientes. O estágio foi direcionado para a pesquisa científica, evidenciando a relevância do estágio supervisionado no contexto acadêmico e contribuindo para a formação profissional.

Palavras-chave: laboratório; fungo; micro-organismos; fitopatologia; treinamento

ABSTRACT

The supervised internship was conducted in the Mycology laboratory of the University of Brasília, at the Institute of Biological Sciences, and covers a variety of practical and theoretical activities focused on the study of beneficial and harmful microorganisms in agricultural crops. This work outlines the detailed process involved in the preparation of growth medium, the sterilization of equipment and medium, as well as the isolation, purification and preservation stages of fungi. The fundamental purpose of the internship was the integration of laboratory practices with the knowledge acquired in the classroom. Furthermore, an additional goal was to improve social management, recognizing that in all professional spheres, human relations play a crucial role in the good performance and development of productive and efficient activities. The internship was aimed at scientific research, highlighting the relevance of supervised internships in the academic context and contributing to professional formation.

Keywords: laboratory; fungi; microorganisms; phytopathology; training

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna encontra-se diante de um panorama desafiador quanto à crescente demanda por alimentos. As mudanças climáticas têm implicações cada vez mais graves, afetando a produtividade das colheitas e colocando em risco a segurança alimentar. A gestão do solo e a escassez de recursos naturais adicionam camadas a esses desafios, ampliando a urgência de encontrar soluções inovadoras e sustentáveis.

O reino Fungi representa o segundo maior grupo de organismos vivos com aproximadamente 140 mil espécies descritas (LUCKING et al., 2020) e uma riqueza estimada entre 2,2 a 3,8 milhões de espécies (HAWKSWORTH & LUCKING, 2017). Muitas espécies atuam em processos fitopatogênicos em espécies nativas florestais e em vegetais importantes à sobrevivência humana (BRADER et al., 2017).

Abreu et al. (2015) apontam que, entre os organismos vivos, os fungos têm se destacado como fonte primordial de contribuições que vão desde a esfera alimentar até a farmacêutica, por exemplo. Sua capacidade singular de degradar matéria orgânica, produzir enzimas úteis na indústria, bem como seu papel simbiótico em associações benéficas para as plantas, os tornam peças-chave na busca por soluções eficazes e sustentáveis para a agricultura.

Os fungos desempenham funções importantes para as plantas. Alguns formam parcerias benéficas, como as micorrizas, que auxiliam na absorção de nutrientes. Por outro lado, alguns são danosos, provocando doenças que prejudicam o crescimento das plantas. Com isso, essa diversidade de interações fúngicas tem um impacto direto na saúde e no desenvolvimento das plantas, sendo necessário a realização de diferentes estudos.

O estágio realizado ofereceu uma visão aprofundada sobre a importância desses organismos. Ao explorar sua diversidade, interações e aplicações, foi possível compreender de forma mais abrangente como os fungos desempenham um papel crucial na agricultura moderna e como suas características únicas podem ser aproveitadas para enfrentar os desafios atuais.

Este relatório visa, portanto, descrever as atividades realizadas durante o período do estágio sobre a manipulação de fungos.

2. OBJETIVO

Documentar as atividades desenvolvidas com supervisão técnica em relação a manipulação de fungos no laboratório de Micologia, localizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, Brasília, DF.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Reino Fungi

O Reino Fungi representa um grupo diverso de micro-organismos, incluindo organismos unicelulares (leveduras) e multicelulares (fungos filamentosos), como cogumelos e bolores. Esses organismos crescem nos mais diversos substratos sob diferentes condições ambientais e se dispersam na natureza por meio de diferentes agentes, como ar, água, animais, sementes, insetos e seres humanos. O elevado número de espécies é observado por uma diversidade de caracteres morfológicos e propriedades biológicas em uma ampla gama de funções e interações no ecossistema (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

Espécies desse reino possuem parede celular composta por glucanas e quitina. São seres eucarióticos, possuindo um ou mais núcleos, e dependendo da fase do ciclo de vida podem ser haploides, dicarióticos ou diploides. Quanto à reprodução, podem ocorrer processos sexuais (através de cariogamia e meiose), parassexuais (com cariogamia seguida de aneuploidia) e/ou assexuais (via divisão nuclear mitótica). Sua nutrição se dá de forma quimio-heterotrófica, obtendo nutrientes a partir da absorção de compostos orgânicos como fontes de carbono e energia. Devido à sua habilidade em aproveitar uma vasta gama de compostos orgânicos, conseguem habitar ambientes diversos, como solo e água do mar, além de estabelecer relações com plantas, animais, insetos e detritos (TAKAHASHI et al., 2007; SILVA & MALTA, 2016).

Esses micro-organismos têm a capacidade única de estabelecer relações simbióticas benéficas ou atuar como parasitas de outras espécies. Sua nutrição se baseia na absorção de carboidratos, aminoácidos, sais minerais, fosfolípidos, entre outros, sendo fundamental a liberação de enzimas para desdobrar e decompor esses nutrientes complexos. Essa habilidade enzimática é essencial para seu papel vital na reciclagem de nutrientes no ambiente (SILVA & MALTA, 2016).

Antes conhecidos, principalmente, por sua relação benéfica com o solo e as plantas, oferecendo benefícios como biofertilização e proteção contra doenças, atualmente os fungos são amplamente utilizados como soluções seguras no controle de pragas e também na produção de substâncias medicinais. Além disso,

desempenham um papel significativo na indústria alimentícia desde produtos tradicionais a novos segmentos desse setor (BENNETT, 1998).

Os fungos exercem papéis ambivalentes na ecologia das plantas, agindo como aliados e também como desafios significativos. Quando atuam como parceiros simbióticos, contribuem para o equilíbrio do ecossistema, auxiliando na absorção de nutrientes pelas plantas e promovendo sua saúde. No entanto, como patógenos, podem desencadear doenças que prejudicam a produtividade agrícola e a vitalidade das plantas, levando a perdas consideráveis durante o cultivo (BERUDE et al., 2015; FIGUEIREDO, 2001).

3.1.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos exibem um de crescimento onde micélios, visíveis a olho nu, se compõem de hifas longas, ramificadas e interconectadas. Essas hifas se estendem, explorando e colonizando seu ambiente, formando uma interligação que se adapta e se expande para explorar novos recursos e substratos. Essa estrutura complexa facilita sua capacidade de absorver nutrientes e interagir com o ambiente ao seu redor (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Eles se distinguem pela sua facilidade de cultivo, pois liberam suas enzimas diretamente no meio de cultivo, eliminando a necessidade de romper a célula para liberá-las. Eles exercem um papel significativo na vida humana e no meio ambiente, contribuindo para a produção de alimentos, produtos de saúde e para o ciclo de compostos na biosfera (NASCIMENTO et al., 2014).

A identificação dos fungos filamentosos ocorre, principalmente, através de duas abordagens: a taxonomia clássica e a biologia molecular. Na taxonomia clássica, são observadas características macroscópicas, como a superfície e o reverso da colônia, bordas, diâmetro, cores dos esporos e do micélio, textura, presença de exsudados e pigmentos solúveis. Além disso, são consideradas características microscópicas, como a forma e cor das hifas, presença de septos e o tipo e arranjo dos esporos (TAKAHASHI et al., 2007).

A identificação dos fungos filamentosos por meio da biologia molecular envolve o uso de várias técnicas que buscam compreender sua estrutura genética e composição. Isso inclui a análise de sequências de DNA, onde se amplificam partes específicas do genoma fúngico para comparar com bancos de dados genômicos e identificar as espécies. Técnicas como PCR e sequenciamento de nova geração são empregadas para uma identificação precisa, juntamente com a análise de expressão gênica e marcadores moleculares (BALAJEE et al., 2007).

3.2 Atividades realizadas no laboratório

3.2.1 Manipulação de fungos em uma câmara de fluxo laminar

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são fungos frequentemente manipulados em laboratórios de micologia, como foi o caso desse estágio supervisionado, devido à sua significativa influência, tanto benéfica quanto danosa, sobre as plantas e o solo. Eles são estudados por sua capacidade de controle de patógenos, promoção do crescimento das plantas e, ao mesmo tempo, por poderem contaminar cultivos e produzir toxinas. Sua manipulação visa oferecer alternativas sustentáveis para proteger as plantas e melhorar a saúde do ambiente agrícola, enfrentando desafios na agricultura (SILVA et al., 2023).

Para realizar manipulações de fungos é necessário manter condições rigorosas de assepsia para prevenir a contaminação do material e do ambiente de cultivo. Os fungos e bactérias contaminantes normalmente são eliminados utilizando produtos químicos e/ou luz ultravioleta. Dessa forma, para manter o local de trabalho isento de contaminações, normalmente os fungos são manipulados em uma câmara de fluxo laminar. Esse equipamento possui uma circulação de ar direcionada para um filtro que retém a maioria dos contaminantes (CAROLLO & FILHO, 2016).

Antes da utilização, a câmara de fluxo laminar é higienizada utilizando álcool etílico a 70% em toda superfície interna. Todo material a ser utilizado é higienizado com álcool 70% e a luz ultravioleta é ligada por um período de dez minutos. Após a utilização da luz ultravioleta, o material vegetal e as amostras biológicas são colocados no interior da câmara de fluxo laminar. Durante a manipulação das

amostras é necessário remover qualquer material desnecessário, como relógios e anéis para evitar contaminações (TORTORA et al., 2017).

3.2.2 Desinfetantes líquidos

É fundamental empregar desinfetantes líquidos para esterilizar equipamentos, instrumentos e realizar a assepsia superficial do tecido vegetal para procedimentos de isolamento. Geralmente, são usados álcool etílico a 70% e hipoclorito de sódio a 1% para essa finalidade (CAROLLO & FILHO, 2016).

3.2.3 Autoclave

A autoclave é um equipamento altamente eficiente para esterilizar uma ampla variedade de material, desde plásticos autoclaváveis a meios de cultura. Além disso, é utilizado para inviabilizar micro-organismos antes do descarte. O método de esterilização a calor úmido, via vapor saturado, é desenvolvido para atingir temperaturas superiores a 100 °C, controlando a pressão do vapor da água ou, inversamente, alcançando pressões superiores à atmosférica (CAROLLO & FILHO, 2016).

Materiais que são resistentes ao calor, como solo, sementes e pó, requerem esterilização em pequenas quantidades e por períodos mais longos. Isso também acontece em casos de material altamente contaminado, em que o tempo de esterilização deve ser prolongado para uma melhor esterilização. Além desse material, a autoclave esteriliza placas de Petri, microtubos, água, soluções, meios de cultura e ponteiras. No entanto, é válido ressaltar que para garantir a segurança e evitar danos ao material e meios de cultura durante o processo de esterilização é fundamental seguir os procedimentos de acordo com as instruções do equipamento e do material a ser esterilizado (CAROLLO & FILHO, 2016).

3.2.4 Meios de cultura

Os meios de cultura consistem em substâncias ou soluções aplicáveis no crescimento e seletividade de micro-organismos, principalmente para a identificação de uma determinada espécie (FERNANDEZ, 1993). Para garantir um ambiente propício ao crescimento do fungo desejado, é essencial fornecer fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e outros elementos de crescimento. Além disso, é importante considerar a frequência de luz e monitorar cuidadosamente o pH do meio para criar condições ótimas que favoreçam seu desenvolvimento (CAROLLO & FILHO, 2016).

Para isolar um fungo, normalmente o ágar batata dextrose (BDA) é utilizado devido ser um meio rico em nutrientes. O BDA é um dos meios de cultura mais comuns e versáteis utilizados para o cultivo de fungos em laboratórios, sendo especialmente eficaz para o cultivo de fungos filamentosos, como *Aspergillus* e *Penicillium*. Ele consiste em uma combinação de batata, que fornece nutrientes como carboidratos, vitaminas e minerais essenciais para diversos fungos, e dextrose, que serve como fonte de energia na forma de açúcar simples para o metabolismo fúngico. O ágar é incorporado como agente solidificante, proporcionando uma base sólida para o crescimento dos micro-organismos no meio de cultura. É utilizado, principalmente, para isolamento e cultivo de fungos em aplicações de pesquisa, diagnóstico e estudo de processos fúngicos (ZAUZA et al., 2007).

3.3 Isolamento, purificação e preservação de fungos

3.3.1 Isolamento

Ao lidar com uma planta infectada, inicialmente é necessário separar o organismo responsável pela enfermidade para identificação, caracterização ou estudos posteriores. Isolar um micro-organismo implica mantê-lo livre de outras formas de vida, criando o que é conhecido como uma cultura pura (FERNANDEZ, 1993).

O isolamento bem sucedido de um patógeno exige a transferência desse organismo para um ambiente que favorece seu crescimento, superando a

competição de outros micro-organismos. A habilidade técnica em separar o organismo desejado de outros é crucial para obter um isolamento cultural eficaz (CAROLLO & FILHO, 2016).

Diversas técnicas são empregadas para isolar patógenos, considerando características como o tipo de tecido afetado, o estágio de desenvolvimento do patógeno e o substrato. De acordo com ZAUZA et al. (2007), as abordagens primárias são o isolamento direto e o isolamento indireto. No processo de isolamento direto, ocorre a transferência direta das estruturas do patógeno para o meio de cultura utilizando algum material como um estilete. E no isolamento indireto são fornecidas porções de tecido hospedeiro infectado ou sementes contaminadas para o meio de cultura, mesmo na ausência de estruturas visíveis do micro-organismo.

3.3.2 Purificação

Após o isolamento de um fungo é recomendável purificar a linhagem para criar culturas compostas por esporos individuais. A partir das amostras obtidas no isolamento, colônias fúngicas são selecionadas com base em suas características morfológicas, visando identificar aquelas que representam o fungo desejado. Esse processo é repetido diversas vezes para garantir a obtenção de uma linhagem pura, livre de contaminações por outros micro-organismos (CAROLLO & FILHO, 2016).

A manutenção de condições assépticas é fundamental ao longo do procedimento, a fim de garantir a pureza da cultura. Esta metodologia desempenha um papel importante em pesquisas externas para a identificação, caracterização e estudos de patogenicidade de fungos (ZAUZA et al., 2007).

3.3.3 Preservação

3.3.3.1 Método Castellani

Este método envolve a conservação de micro-organismos utilizando água destilada esterilizada. Trata-se de uma técnica de médio prazo que visa induzir os micro-organismos a um estado de hipobiose, resultando em uma atividade biológica reduzida devido à restrição de oxigênio, o que diminui o crescimento e o

metabolismo. O armazenamento pode ser realizado à temperatura ambiente, sem risco de infestação por ácaros, e representa uma técnica de custo acessível. Em geral, esse método confere uma longevidade de 1 a 6 anos às culturas, variando de acordo com o micro-organismo preservado (CASTELLANI, 1967).

3.3.3.2 Método de ultracongelamento

Esse método de ensaio visa conservar micro-organismos por meio do congelamento em ultrafreezer. Trata-se de uma técnica de preservação de longo prazo que busca induzir os micro-organismos a um estado de anabiose, caracterizado pela inatividade celular, porém sem estar morto. Em outras palavras, esse processo envolve a capacidade da célula de suspender reversivelmente ou reduzir drasticamente seu metabolismo, alcançando um estado de pouca ou nenhuma atividade. Para essa prática, é recomendado o uso de um agente crioprotetor, como o glicerol, que aumenta a taxa de sobrevivência das células durante o congelamento (UZUNOVA-DONEVA & DONEV, 2005).

3.3.4 Repicagem

A repicagem de fungos é um procedimento no qual se transfere uma porção de micélio (estrutura vegetativa do fungo) de uma cultura para um novo meio de crescimento. Isso se dá para manter a linhagem ou expandir a cultura do fungo em um novo substrato. Geralmente, uma pequena quantidade de micélio é retirada da cultura original e transferida para um novo meio de cultura, promovendo assim o crescimento contínuo do fungo, sendo importante para a preservação, estudo e análise contínua de fungos em laboratórios de pesquisa e diagnóstico fitopatológico (NAKASONE et al., 2004).

4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

4.1. Caracterização da região e o local de desenvolvimento do estágio

O estágio foi realizado no Departamento de Fitopatologia localizado no bloco C do Instituto de Biologia, localizado ao sul do Instituto Central de Ciências (ICC), no Campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília.

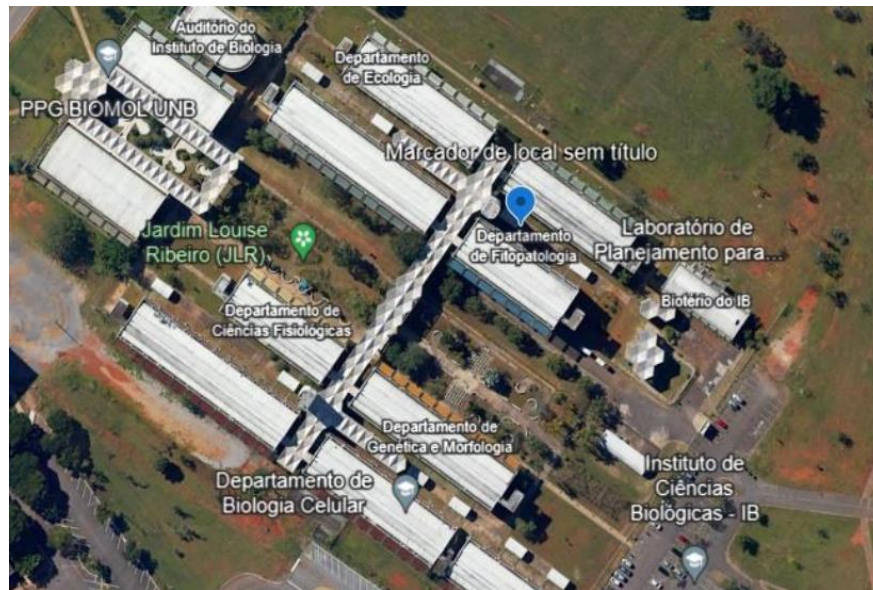


Figura 1 - Visualização aérea do Instituto de Biologia
Fonte: Google Earth (2023)

5. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO

O laboratório de Micologia, situado no Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, abriga mais de 23.000 exemplares de fungos preservados na Coleção Micológica do Herbário UB. Além das instalações destinadas ao armazenamento desses exemplares, o laboratório conta com uma sala específica mantida a 17°C para conservar culturas fúngicas, bem como duas salas espaçosas destinadas à condução de pesquisas. Estes espaços estão equipados com o necessário para investigações e projetos de extensão nas áreas de Microbiologia, Micologia, Microscopia e Diagnóstico de doenças de plantas.

5.1 Infraestrutura do laboratório

O laboratório possui uma diversidade de equipamentos, incluindo microscópios de luz e estereomicroscópios acoplados a câmeras para captura de imagens; ferramentas para prepo de lâminas e análise de características morfológicas; freezers verticais e horizontais para armazenamento e congelamento de amostras fúngicas, ultrafreezer -80°C e um botijão contendo nitrogênio líquido para preservação de culturas fúngicas. Além disso, há um micrótomo criostático para obtenção de cortes ultrafinos; aparelhos GPS para registro de coordenadas geográficas; câmeras digitais para captura de sintomas no campo; estufas, autoclaves, câmaras de fluxo laminar e incubadoras para manipulação de culturas fúngicas. Também estão disponíveis equipamentos como balanças analíticas, banhos secos, disruptores de células, centrifugas, agitadores, pipetas para extração de DNA e PCR, termocicladores, cubas e fontes para eletroforese, bem como um transluminador para análise de géis de agarose. Além da estrutura do laboratório, o Departamento de Fitopatologia possui estufas para o cultivo de plantas e a realização de testes experimentais.



Figura 2 - A) Incubadora; B) Bancada com equipamentos
Fonte: Acervo pessoal (2023)



Figura 3 - A) Bancada com equipamentos; B) Microscópio de luz Leica
Fonte: Acervo pessoal (2023)

5.2 Linha de pesquisa do laboratório

O laboratório possui um grupo de pesquisa conhecido como "Diversidade, prospecção e coleção de fungos do Cerrado" que é composto por estudantes de diferentes níveis acadêmicos, incluindo iniciação científica, mestrado, doutorado, além de professores como o professor Danilo Batista Pinho, o professor Helson

Mário Martins do Vale e o professor emérito José Carmine Dianese. A principal ênfase deste grupo está na identificação precisa dos fungos que estão associados tanto às espécies nativas do Cerrado quanto às plantas cultivadas com relevância econômica. A abordagem utilizada para a identificação desses fungos envolve métodos morfológicos, fisiológicos e moleculares (SBMic, 2022).

Este grupo tem se dedicado a explorar diferentes conjuntos de espécies ligadas a doenças que impactam cultivos de importância econômica. Para compreender as relações filogenéticas entre essas espécies, têm empregado não apenas análises moleculares, mas também novas técnicas para identificar precisamente esses fungos. Isso engloba a criação de iniciadores específicos para determinadas espécies, a procura por novos marcadores moleculares, o desenvolvimento de sondas para identificação de patógenos via qPCR e amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). A diversidade fúngica é explorada principalmente por meio do isolamento, sequenciamento desses organismos e também por uma abordagem metagenômica (SBMic, 2022).

Além das atividades de pesquisa, esses professores se envolvem em divulgar o conhecimento sobre micologia para estudantes de ensino médio e graduação, utilizando o Museu de Biologia da UnB. Além disso, ministram disciplinas como Micologia para estudantes de graduação em diferentes áreas. Há também a oferta da disciplina Fungos Fitopatogênicos para os cursos de mestrado e doutorado em Biologia Microbiana e Fitopatologia (SBMic, 2022).

6. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO

6.1 Preparação de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA)

O preparo de 1000 mL do meio batata dextrose ágar (BDA) foi realizado utilizando o reagente da empresa Sigma Aldrich (código 70139) na proporção recomendada de 39 g/L indicada pelo fabricante. Foram pesados 39 gramas do reagente e adicionados a um frasco de vidro, seguidos pela adição de 1000 mL de água destilada. A fim de facilitar o vertimento do meio posteriormente, a quantidade total foi dividida em dois frascos com 500 mL de meio cada. Após agitar os frascos para assegurar a homogeneização das soluções procedeu-se à esterilização do meio em autoclave a 121°C por 15 minutos, mantendo rigorosas condições de assepsia durante todo o processo para evitar qualquer contaminação.

6.2 Vertimento de meio

O meio BDA no estado sólido foi aquecido em um forno de micro-ondas para retornar ao estado líquido. Em seguida, aproximadamente 10 mL do meio foram transferidos para uma Placa de Petri de 90 mm de diâmetro. As placas foram dispostas parcialmente fechadas para solidificação do meio sem a condensação de água na superfície. Após o resfriamento do meio, as placas foram vedadas com filme plástico para impedir a contaminação do meio e manter a umidade.

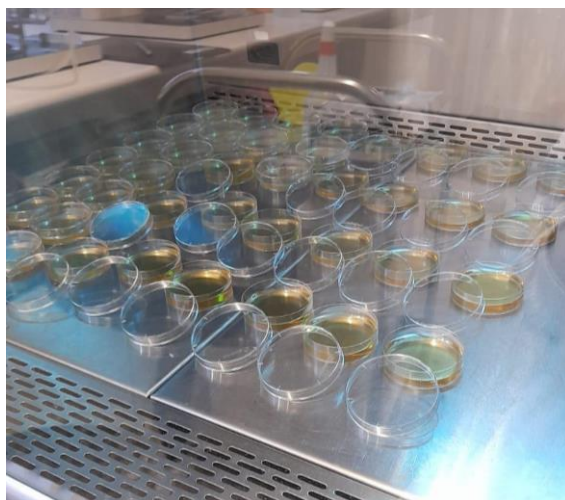


Figura 4 - Placas de Petri com meio BDA solidificando
Fonte: Acervo pessoal (2023)

6.3 Reativação de fungos

Reativar um fungo implica viabilizar o retorno à atividade metabólica, assim, a fim de estudar cepas em estoque, alguns fungos foram transferidos do estoque para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). Posteriormente, os fungos foram incubados em temperatura de 28°C por 7 a 10 dias, com um fotoperíodo de 12 horas. Cada amostra do estoque foi reativada em placas de Petri, sendo cada tubo correspondendo a uma placa do meio. Após o período de crescimento, os aspectos morfológicos foram avaliados visualmente.



Figura 5 - Reativação de fungos em meio BDA
Fonte: Acervo pessoal (2023)

6.4 Preservação de fungos

Quanto à preservação dos fungos, foram empregados dois métodos. O primeiro, método Castellani (1967), consistiu em coletar com auxílio de ponteiros p1000 esterilizadas (invertidas) discos de micélio (com aproximadamente 8 mm de diâmetro) de culturas puras, com cerca de 10 dias de idade, e transferi-los para criotubos de tampa de rosca de 4,5 mL contendo 3 mL de água ultrapura esterilizada. Os discos foram submersos para evitar o contato com o ar, sendo os

tubos armazenados à temperatura ambiente em um armário. O segundo método foi o de ultracongelamento, no qual os discos de micélio foram transferidos para criotubos de 2 mL (com tampa de rosca) contendo 1 mL de solução esterilizada de glicerol 10%, ficando totalmente submersos na solução. Os tubos foram imediatamente preservados em um ultrafreezer a -80°C . Cada fungo foi preservado em triplicata ou quadruplicata em ambos os métodos.

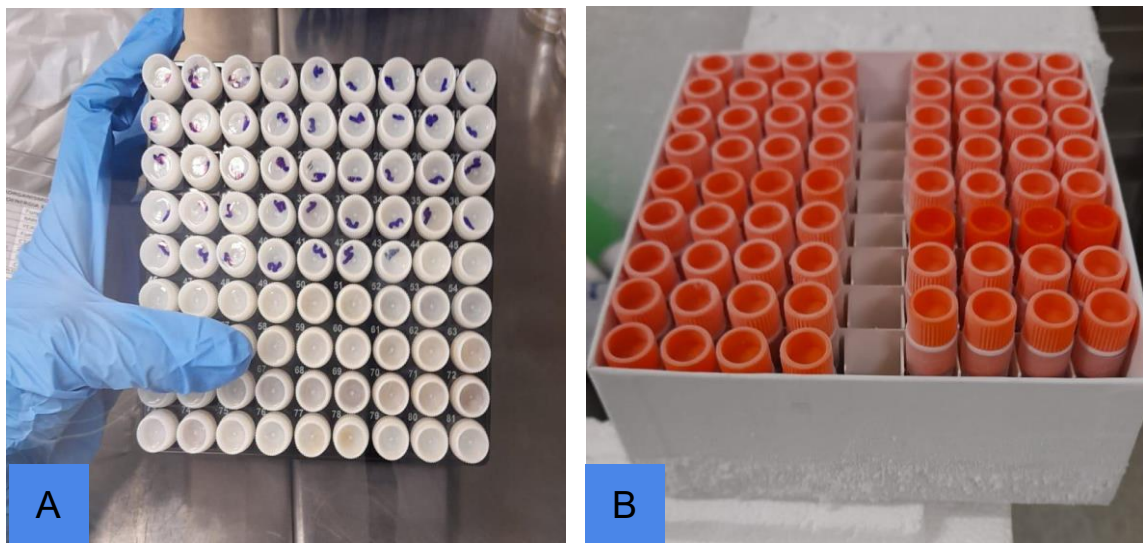


Figura 6 - A) Tubos com água destilada esterilizada (método Castellani); B) Criotubos com glicerol 10% (método de ultracongelamento)
Fonte: Acervo pessoal (2023)

6.5 Repicagem de culturas fúngicas

Na câmara de fluxo laminar, devidamente esterilizada com etanol 70% e luz UV, os tubos contendo fungos foram separados. A linhagem correspondente às placas de Petri foi identificada, dando início ao processo de repicagem. O primeiro tubo foi aberto e uma porção do fungo foi retirada com um palito de madeira esterilizado; em seguida, o recipiente foi fechado. Posteriormente, a tampa da placa correspondente foi removida e a alça contendo o fungo foi introduzida no centro da mesma. Após esse procedimento, a placa foi fechada e o processo foi repetido com os demais tubos pertencentes à linhagem, vedando-se as placas com filme plástico. Por fim, foram colocadas em uma incubadora a 28°C e com fotoperíodo de 12 horas.



Figura 7 - Repique de fungos em meio de cultura

Fonte: Acervo pessoal (2023)

7. ÁREA DE IDENTIFICAÇÃO DO CURSO E ANÁLISE CRÍTICA

O estágio realizado no laboratório de Micologia tem como áreas de identificação, principalmente, biologia, microbiologia e fitopatologia. Essa estrutura acadêmica proporciona a oportunidade de explorar diversas áreas de conhecimento e especialização.

No curso de Agronomia se destaca a área de fitopatologia na qual o estudante tem a oportunidade de adquirir habilidades teóricas e práticas para lidar com a associação de plantas e fungos. Isso pode envolver técnicas de diagnóstico e manejo de controle de doenças causados por fungos a fim de aprimorar a produção agrícola. Além disso, a aplicação de conhecimentos sobre micologia na agricultura permite a implementação de abordagens sustentáveis visando a produtividade do cultivo e preservação do meio ambiente.

Com isso, o estágio oferece uma oportunidade valiosa para os estudantes aplicarem conhecimentos adquiridos em sala de aula em um ambiente prático, aprofundando sua compreensão sobre a micologia e sua relevância na agricultura. Também oferece uma perspectiva dos desafios agrícolas reais, incentivando o aprimoramento de algumas habilidades como o pensamento crítico, resolução de problemas e trabalho em equipe.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do Estágio Supervisionado Obrigatório no laboratório de Micologia da Universidade de Brasília foi extremamente gratificante. Essa vivência proporcionou um aprendizado técnico valioso, aprimorando minhas competências práticas e reforçando os conceitos teóricos adquiridos em sala de aula durante a graduação.

Ao longo desse período, aprimorei habilidades práticas, como técnicas laboratoriais e tomada de decisões em um ambiente científico dinâmico. Lidar com desafios e situações imprevistas fortaleceu minha adaptabilidade e autonomia, habilidades essenciais para qualquer profissional na área científica. Além disso, o contato com profissionais experientes e a colaboração em equipe foram aspectos fundamentais que ampliaram o conhecimento sobre a importância da interação entre experiência e trabalho em equipe.

Durante o estágio, participei ativamente em projetos de pesquisa, colaborando em análises, coleta de dados e experimentos. Essas atividades ampliaram minha compreensão sobre a relevância das pesquisas microbiológicas, especialmente em relação à compreensão da importância dos fungos quanto às suas aplicações em diferentes áreas do conhecimento, principalmente, nas ciências agrárias. Assim, essa experiência enriqueceu minha visão sobre o potencial transformador desses micro-organismos em diferentes setores.

Por fim, a experiência no laboratório de Micologia foi essencial para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal, aumentando meu interesse pela microbiologia e me direcionando para a carreira acadêmica-científica. Além disso, contribuiu significativamente para ampliar meus conhecimentos e habilidades relacionados à minha formação profissional.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.A.S. de.; ROVIDA, A.F. da S.; PAMPHILE, J.A. [online]. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revisão Uningá**, [S. l.], v. 1, 2015. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1613>. Acesso em: 10 nov. 2023.

ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. [online]. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.9-90. (Embrapa-CNPAC. Documentos, 44). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/199948/1/doc44.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2023

BALAJEE, S. A.; SIGLER, L.; BRANDT, M. E. [online]. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. **Medical Mycology**, v.45, 2007. p.475-90. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/45/6/475/985830>. Acesso em: 21 dez. 2023

BENNETT, J. W. [online]. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of biotechnology**, v. 66, n. 2-3, p. 101-107, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165698001333/pdf?md5=88b29701578e45ac432a34659328bba0&pid=1-s2.0-S0168165698001333-main.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2023

BERUDE, M; ALMEIDA, D.; RIVA, M.; CABANÊZ, P.; AMARAL, A. [online]. Micorrizas e sua importância agroecológica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2015E/Micorrizas.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2023.

BRADER, G.; COMPANT, S.; VESCIO, K.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; MA, L.J.; SESSITSCH, A. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 61-83, 2017

CAROLLO, E.M.; FILHO, H.P.S. [online]. **Manual básico de técnicas fitopatológicas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura BA, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148757/1/Cartilha-ManualFito-215-14-Hermes.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2023

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water: Further researches. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. EDUCS. Caxias do Sul, 2004.

FERNANDEZ, M. R. [online]. **Manual para Laboratório de Fitopatologia**. Passo Fundo : EMBRAPA-CNPT, 1993. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/84049/1/CNPT-DOCUMENTOS->

6-MANUAL-PARA-LABORATORIO-DE-FITOPATOLOGIA-LV-2008-01273.pdf.
Acesso em: 23 nov. 2023

HAWKSWORTH, D.L.; LUCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, p. 10.1128

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R., GODINHO, P.D.S.; ABRÃO, R.L. [online]. A particularidade de ser um fungo—I. Constituintes celulares. **Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17-27, 2006. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/21201/19172>. Acesso em: 13 dez. 2023

LUCKING, R.; AIME, M.C.; ROBBERTSE, B.; MILLER, A.N.; ARIUAWANSA, H.A.; AOKI, T.; CARDINALI, G.; CROUS, P.W.; DRUZHININA, I.S.; GEISER, D.M.; HAWKSWORTH, D.L. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? **IMA fungus**, v. 11, n. 1, p. 1-32, 2020

NASCIMENTO, K. B. M.; MARTINS, A. G. R.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A.; OKADA, K. [online]. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* sp isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 95-103, 2014. Disponível em: <https://unibh.emnuvens.com.br/dcet/article/download/1146/673>. Acesso em: 13 dez. 2023

NAKASONE, K. K.; PETERSON, A. W.; JONG, S. Preservation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 37-47, 2004.

SBMic. [online]. Micologistas do passado: entre posteridade e anonimato. Devemos nos importar? Boletim Micobiota, Rio de Janeiro, v.2, n.4 p.1-28, out-dez 2022. Disponível em: https://sbmic.org/admin/files/papers/file_FwRbQVsMVWEG.pdf. Acesso em: 18 dez. 2023

SILVA, C. J. ALVES da; MALTA, D. J. A do N. [online]. Importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências Biológicas e da Saúde Pernambuco**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 49, 2016. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/facipesaude/article/view/3210>. Acesso em: 21 nov. 2023.

SILVA, E.D.da.; SANTOS, E.E de. S.; SANTOS, A dos.; OLIVEIRA, F.J.V de. [online]. Controle biológico de patógenos pós-colheita em videira. **Scientific Electronic Archives**, v. 16, n. 8, 2023. Disponível em: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1760>. Acesso em: 21 dez. 2023

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S., SANTOS, G. F. dos.; LYRA, F. H.; HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. [online]. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.6, p.2351-2382, 2017. Disponível em: <https://s3.sa-east->

1.amazonaws.com/static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n6a15.pdf Acesso em: 17 dez. 2023

FIGUEIREDO, M. B. [online]. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. **O Biológico**, v. 63, n. 1, p. 29-32, 2001. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/downloads/ferrugem004.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2023

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. [online]. **Microbiologia**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1XDaSn0pEHGUesj47E5I5pgGlzxELJLpQ/view>. Acesso em: 12 dez. 2023

UZUNOVA-DONEVA, T.; DONEV, T. Anabiosis and Conservation of Microorganisms. **Journal of Culture Collections**, vol. 4, p. 17-28, 2005.

ZAUZA, E. A. V, ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. [online]. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Lavras: UFV, cap. 1, p. 27-53, 2007. Disponível em: <https://design.jet.com.br/editoraufv/documentos/DEGUSTA%C3%87%C3%83O%20-%20CONHE%C3%87A%20E%20LEIA%20ESSA%20OBRA..pdf>. Acesso em: 17 dez. 2023