

Preservação em longo prazo do fungo entomopatogênico de lepidópteros, *Nomuraea rileyi* a -20°C

PIOTTO, B.K.¹; SOSA-GÓMEZ, D.R.² ¹Uenp, Bolsista CNPQ/PIBIC- Brasil; ²Embrapa Soja | piotto@cnpso.embrapa.br

Introdução

O controle biológico, através da utilização de microorganismos entomopatogênicos, sem agressão ao ambiente, vem se mostrando uma alternativa eficaz e viável no controle de pragas (Alves 2008). Entre esses microorganismos, o fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson é um agente de controle biológico de lepidópteros pragas de diversas culturas, principalmente de lagartas da família Noctuidae, destacando-se: *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, *Chyso-deixis includens* (Walker, 1859), *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805, *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852), *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) e outros lepidópteros pragas importantes da cultura da soja e do algodão. Em condições apropriadas, principalmente umidade elevada, o fungo é capaz de produzir epizootias, podendo reduzir drasticamente populações de pragas, como relatado nos EUA, Brasil, Argentina e Austrália (Corrêa & Smith 1975, Carner 1980, Ignoffo 1981, Lecuona 1990).

No entanto, a epizootia nem sempre ocorre a tempo de evitar que as pragas causem dano econômico à cultura. Este fungo, em condições de cultivo, estocagens e repicagens sucessivas pode ter sua virulência alterada, constituindo, portanto, um entrave para a utilização no controle biológico (Alves, 1998). O método de armazenamento em sílica é de baixo custo, e os insumos utilizados são de fácil disponibilidade. Considerando a falta de informações sobre o armazenamento desse fungo, o presente trabalho teve como objetivo determinar a viabilidade de *N. rileyi* após a preservação a longo prazo em sílica gel a -20°C visando evitar repicagens sucessivas e que a recuperação seja de fácil manuseio.

Material e métodos

Foram utilizados 33 isolados de *N. rileyi*, armazenados em sílica-gel a -20°C entre os anos de 1998 a 2005. A técnica de armazenamento foi descrita por Sinclair et al. (1995). As informações relativas aos isolados podem ser encontradas em Sosa-Gomez (2002). Para avaliar a viabilidade dos isolados utilizou-se o meio de cultura SMAY, 2,5g de neopeptona, 10g de maltose, 2,5g de extrato de levedura, 3,75g de ágar e 250ml de água, e após a diluição dos compostos e esterilização em autoclave a 120°C/20min, foi acrescentado 1% de hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). O meio de cultura foi distribuído em placas de polipropileno esterilizadas (60 mm x 15 mm) utilizando 10ml por placa. Para avaliar a viabilidade, foram depositadas 5 a 6 pedras de sílica com os isolados armazenados. As placas foram mantidas em BOD, no escuro, com temperatura constante de 26°C. A avaliação da viabilidade se realizou após 15 dias de incubação. Cada placa foi considerada uma repetição e para cada isolado armazenado foram utilizadas seis placas. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado. Para avaliação da viabilidade foram atribuídas notas considerando a seguinte escala: sem crescimento = 0, micélio incipiente = 1, micélio pouco desenvolvido = 2, micélio com crescimento médio = 3, micélio bem desenvolvido = 4 e micélio abundante = 5. A mesma escala foi utilizada considerando os níveis de esporulação. As notas foram analisadas por estatística não paramétrica, utilizando-se

para as comparações o teste de Dunnett considerando como isolado controle CNPSO-Nr149 devido a que permaneceu viável por um período prolongado.

Resultados e discussão

De forma geral, os 33 isolados de *N. rileyi* apresentaram crescimento micelial (Fig.1) e não foram observadas diferenças significativas entre eles. Entretanto, o armazenamento não afetou a capacidade de formar conídios de todos os isolados por igual (Fig.2). É interessante destacar que o isolado CNPSO-Nr149, armazenado durante 15 anos e 8 meses, foi o fungo armazenado por mais tempo e foi o que apresentou maior esporulação. O único isolado que apresentou crescimento mas sua capacidade conidiogênica foi severamente afetada foi o CNPSO-Nr32, armazenado por 14 anos e 9 meses. A tabela 1 retrata os isolados com seus respectivos meses de armazenamento.

A técnica de armazenamento em sílica gel a -20°C é de custo reduzido e não há necessidade de preocupação permanente como no caso de armazenamento em N₂ líquido. Adicionalmente, o armazenamento mediante liofilização parece não ser uma técnica adequada para *N. rileyi*. FARIA et al. (1999), demonstraram uma redução evidente da viabilidade dos conídios de *N. rileyi* quando foi preservada liofilizada por um período variável entre 16 e 18 meses.

Conclusões

O armazenamento de isolados de *N. rileyi* em sílica gel a -20°C foi apropriado para a preservação por períodos prolongados, entre 8,3 e 15,6 anos.

Referências

ALVES, S. B.; LOPES, R, B. **Controle microbiano de pragas na América Latina, avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 414p, 2008.

ALVES, S.B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ. 1163p. 1998.

CORRÊA, B. S.; SMITH, J. G. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Huebner, in Paraná. **The Florida Entomologist**, v. 58, n.4, p. 280, 1975.

DUNETT, C.W. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. **Journal of the American Statistical Association**, v.50, p. 1096-1121, 1955.

FARIA, M. R. MARTINS I.; MELLO, R; TIGANO, M. S. Entomopathogenic fungal (Hyphomycetes) collection: Assessment of conidial viability. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.34, n.8, p.1497-1503, 1999.

GOOS, R.D.; DAVIS, E.E.; BUTTERFIELD, W. Effect of warming rates on the viability of frozen fungous spores. **Mycologia**, v.59, p.58-66, 1967.

LOPEZ-LASTRA, C.C., BOUCIAS, D.G. Studies on the cellular reactions of *S. exigua* larvae infected with the fungus *N. rileyi*. **The Journal of Invertebrate Pathology**, v.63, 101-102, 1994.

SINCLAIR, J.B. DHINGRA, O.D. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 448.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. da (Org.). **Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. 32 p. (Embrapa Soja. Documentos, 188).

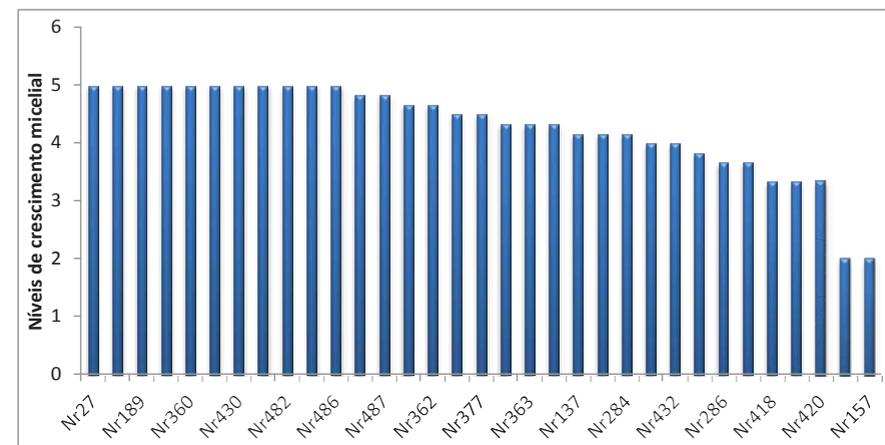


Figura 1. Crescimento micelial de diferentes isolados de *Nomuraea rileyi* (Nr) em meio SMAY, após armazenamento com sílica gel por um período variável entre 9 e 15,7 anos a -20°C . Colunas da mesma cor não apresentam diferenças significativas pelo teste de Dunnett.

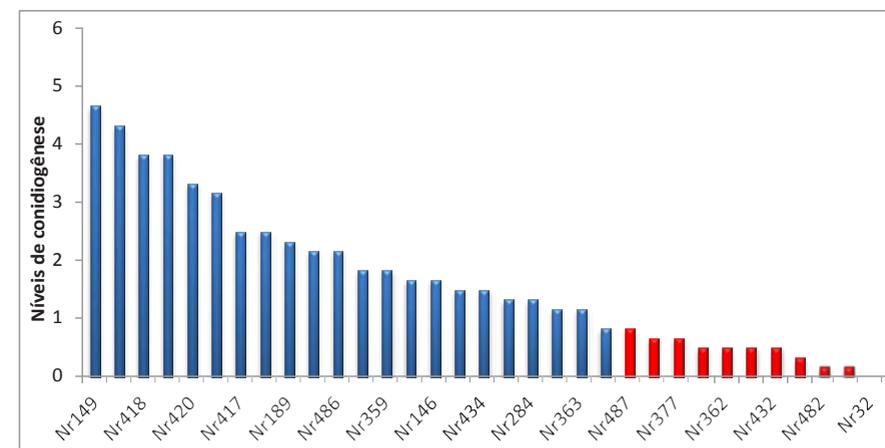


Figura 2. Conidiogênese de diferentes isolados de *Nomuraea rileyi* (Nr) em meio SMAY após armazenamento com sílica gel por um período variável entre 9 e 15,7 anos a -20°C . Colunas de cores diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Dunnett.

Tabela 1- Isolados de *Nomuraea riley* com os respectivos meses de armazenamento.

Isolado	Meses de Armazenamento
Nr 10	110
Nr 27	177
Nr 32	177
Nr 137	184
Nr 146	184
Nr 149	188
Nr 157	184
Nr 172	180
Nr 173	180
Nr 189	180
Nr 284	167
Nr 286	153
Nr 287	167
Nr 359	153
Nr 360	156
Nr 362	156
Nr 363	156
Nr 377	155
Nr 417	142
Nr 418	142
Nr 419	142
Nr 420	142
Nr 421	142
Nr 430	132
Nr 431	132
Nr 432	132
Nr 433	133
Nr 434	132
Nr 481	108
Nr 482	108
Nr 485	100
Nr 486	100
Nr 487	100