VII EAITI 2017 ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA | 09 e 10 de novembro de 2017

CRIOPRESERVAÇÂO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM NITROGENIO LIQUIDO UTILIZANDO GLICEROL COMO CRIOPROTETOR

Letícia Bernadete da Silva (PIBITI/ CNPq), Gabriela Souza Doneze, Dayanne Alves, Daniel Vieira da Silva,

Viviane Sandra Alves (orientadora), vivialves@uenp.edu.br.

Universidade Estadual do Norte do Paraná/Nome do Departamento Centro de Ciências Humanas e da Educação.

Ciências Agrárias: Fitossanidade

Palavras chave:*controle biológico, conservação, glicerol, armazenamento.*

Resumo

O armazenamento e conservação dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) é um obstáculo para o seu uso no controle biológico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o glicerol como crioproteror e a criopreservação como método de armazenamento e conservação dos NEPs. Foram utilizados os nematoides: *Heterorhabiditis bacteriophora* a 5 e 8% de glicerol, *Steinernema carpocapse* a 22% e *Steinernema feltiae* a 13%. As avaliações foram feitas 24 horas, 168 horas e 30, 60, 90 e 120 dias após o congelamento dos NEPs em nitrogênio liquido. Observou-se que todos os isolados apresentaram redução na viabilidade e infectividade ao longo do tempo de congelamento.

Introdução

Os nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* e *Heterorhabitis* são eficazes para o controle biológico, porém a dificuldade no seu armazenamento e conservação é um impedimento na expansão no seu uso (GREWAL et al., 2001). Por outro lado, a criopreservação em nitrogênio líquido como método de armazenamento pode ser uma alternativa, pois irá fazer com que haja uma redução na temperatura e no metabolismo celular preservando dessa forma as células por um período longo e permitindo que seja retomado o desenvolvimento do nematoide após o descongelamento (PEEG, 2007). Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a viabilidade e infectividade de três nematoides a exposição ao glicerol e ao congelamento em nitrogênio líquido.

Material e Métodos

Os NEPs foram multiplicados pelo método *in vivo* segundo metodologia de Molina & López (2001). Para a criopreservação os nematoides ficaram imersos no glicerol em diferentes concentrações de glicerol: *H. bacteriophora* a 5 e 8% *S. carpocapse* a 22% e *S. feltiae* a 13%. Em seguida os isolados foram lavados com metanol para retirar o excesso de glicerol, e os Juvenis Infectantes (JIs) colocados sobre um disco de papel e em criotubulos que foram mergulhados em gelo para posterior estocagem no botijão de nitrogênio líquido. A cada período de incubação (24 horas, 168 horas e 30, 60, 90 e 120 dias) houve o descongelamento em solução salina, e avaliação da viabilidade e infectividade.

Resultados Obtidos

Todos os nematoides avaliados apresentaram redução significativa da viabilidade após 120 dias de congelamento (Tab. 01). Quanto a infectividade *H. bacteriophora* a 5 e 8% e *S. feltiae* não apresentaram diferença significativa nos tempos avaliados. Por sua vez, *S. carpocapsae* apresentou melhor valor de infectividade após 168 horas de congelamento (Tab. 02).

Tabela 1. Porcentagem de viabilidade de Juvenis Infectantes (JIs) de nematoides entomopatogênicos após congelamento em nitrogênio líquido, usando glicerol como crioprotetor.

Tratamentos	24 h	168h	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
H. bact. 5%[1]	21,5a	47,3b	71,7b	73,2b	68,0b	0,0a
H. bact. 8%	40,7b	16,7a	47,2b	75,5b	63,0b	0,0a
S. felt. 13%	77,7	76,7	79,5	70,7	59,2	0,0
S. carp. 22%	78,2b	85,2b	75,0b	76,7b	68,5b	0,0a

[1] H. bact. 5%= *Heterorhabiditis bacteriophora 5%; H. bact. 8% = Heterorhabiditis bacteriophora 8%; S. carp.22% = S. carpocapsae 22%; S. felt. 13% = S. feltiae 13%.*

Tabela 2. Porcentagem de infectividade de Juvenis Infectantes (JIs) de nematoides entomopatogênicos após congelamento em nitrogênio líquido, usando glicerol como crioprotetor.

Tratamentos	24 h	168h	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
H. bact. 5%	2,5a	2,5[a]	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
H. bact. 8%	2,5a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
S. felt. 13%	0,0a	2,5a	12,5a	5,0a	0,0a	0,0a
S. carp. 22%	2,5a	42,5c	15,0b	15,0b	0,0a	0,0a

[1] H. bact. 5%= *Heterorhabiditis bacteriophora 5%; H. bact. 8% = Heterorhabiditis bacteriophora 8%; S. carp.22% = S. carpocapsae 22%; S. felt. 13% = S. feltiae 13%.*

Conclusão

Os tratamentos afetaram tanto a viabilidade quanto a infectividade dos nematoides.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano e ao PIBITI, por expandirem meu conhecimento na área.

[1] GREWAL, P. S.; NARDO, E. A.B. de; AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. Neotropical Entomology, Londrina, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.

MOLINA, J. P.; LOPEZ, N. J. C. Producción in vivo de três entomonematodos con dos sistemas de infección em dos hospedantes. *Revista Colombiana de Entomología*, Bogota, v. 27, n. 1-2, p. 73-79, 2001.

PEGG, D. E. Cryopreservation and freeze-drying protocols methods. In: DAY, J. G.; GLYN, N.; STACEY, G. N. (Ed.). Molecular biology. Totowa: Humana Press, 2007, p. 39-57.