

Influência de diferentes métodos de preservação na viabilidade e virulência do isolado Bb02 de *Beauveria bassiana*

Maria Clemente de Freitas¹; Allan Felipe Marciano²; Caio Júnior Balduino Coutinho Rodrigues³ & Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt⁴

1. Bolsista de Iniciação Científica FAPERJ, discente de Medicina Veterinária/UFRRJ; 2. Mestrando do DPA/IV/UFRRJ; 3. Doutorando do DPA/IV/UFRRJ; 4. Professora do DPA/IV/UFRRJ.

Palavras-chave: Preservação; fungos artropodopatogênicos; morfologia.

Introdução

Rhipicephalus microplus é um ectoparasito de grande importância em medicina veterinária, por ser vetor de agentes patogênicos culminando até mesmo na morte do hospedeiro. Dentre os métodos utilizados no controle alternativo de carrapatos, os fungos artropodopatogênicos, como *Beauveria bassiana*, vem se destacando.

A necessidade da manutenção das colônias de fungos artropodopatogênicos em laboratório faz com que diversos métodos de preservação sejam estudados e testados para determinar sua eficiência e a capacidade de manutenção destes fungos. O armazenamento dos fungos em laboratório pode apresentar desvantagens, como o risco da contaminação, a perda de viabilidade e a perda das características biológicas (mutação). Por esse motivo, encontrar métodos que minimizem essas perdas se torna de suma importância. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo, comparar alguns dos métodos de preservação de fungos com a finalidade de selecionar o mais adequado para a manutenção das colônias em laboratório.

Metodologia

Para realização do presente estudo, foi utilizado o isolado fúngico Bb 02 de *Beauveria bassiana*, e avaliados três métodos de preservação: preservação em água destilada estéril, preservação em óleo mineral estéril e repique contínuo. Para avaliação deste último método, foi utilizada uma placa de fungo repicado a mais de um ano em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), que foi denominado como repique antigo e, outra de fungo repicado em BDA a 15 dias, denominado como repique novo. Para avaliação das características macroscópicas foram feitos pontos únicos de inóculo no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura BDA e para avaliação das características microscópicas foi feito microcultivo entre lâmina e lamínula. Foi realizado um bioensaio com larvas de *R. microplus*, para isso, foram feitas quatro suspensões fúngicas, dispostas da seguinte maneira: 1) com o isolado preservado em óleo, 2) com o isolado preservado em água, 3) com o isolado de repique antigo, 4) com o isolado de repique novo. Em todos os grupos foram utilizadas duas concentrações fúngicas, 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL. O grupo controle recebeu apenas água destilada estéril acrescida de Tween 80 a 0,01%. As larvas foram separadas em alíquotas de 50 mg de ovos e acondicionadas em tubos de ensaio, e divididos em grupos, constituídos por dez réplicas cada. Após 15 dias da eclosão, adicionou-se um mL da respectiva suspensão, que permaneceu em contato com as larvas por três minutos. Após o tratamento, as larvas foram mantidas em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\geq 80\%$ de umidade relativa). O parâmetro avaliado foi o percentual de mortalidade das larvas, observado de cinco em cinco dias até o 20º dia após o tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido do teste Student-Newman-Keuls para a comparação entre as médias em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os métodos de preservação de fungos avaliados no presente trabalho, não modificaram as características macro e micromorfológicas do isolado CG 02, estas se mantiveram semelhantes às descritas por De Hoog (1972), Fernandes (2007) e Rehner et al. (2011) para *B. bassiana*. Na preservação de isolados fúngicos através de baixas temperaturas (água destilada estéril) e da

privação de oxigênio (óleo mineral), o metabolismo fúngico pode ser reduzido, mantendo assim as características morfológicas e patogênicas das colônias (COSTA; FERREIRA, 1991). Após 20 dias do tratamento, foi observado que o grupo tratado com a suspensão do fungo preservado a mais de um ano, por repique contínuo, não apresentou diferença estatística na mortalidade das larvas quando comparado ao grupo controle. Com este resultado, sugere-se que a preservação do isolado Bb02 de *B. bassiana* através de repique contínuo em meio de cultura BDA por um período de tempo prolongado, diminuiu a virulência do isolado fúngico sobre larvas de *R. microplus*. Passador et al. (2010) sugerem que os métodos de repicagens periódicas para fungos devem ser realizados em intervalos de três ou quatro meses, a fim de evitar o consumo total do substrato do meio de cultura e evitar o acúmulo excessivo de metabólitos fúngicos, já que estes se comportam como agentes mutagênicos. Os grupos tratados com as suspensões preparadas a partir de colônias mantidas em óleo, água e repique contínuo novo, apresentaram diferença estatística na mortalidade das larvas quando comparados ao grupo controle; obteve-se um percentual de mortalidade das larvas acima de 50% em ambos os grupos, demonstrando a eficiência destes métodos para preservação de fungos. Os resultados corroboram com Finatti e Aparecido (2009), que utilizaram o óleo mineral, água destilada estéril e repique contínuo para preservação de fitopatógenos fúngicos, e tais métodos apresentaram bons resultados, para longos períodos de preservação.

Conclusão

Com tais resultados pode-se concluir que os métodos de preservação em água e óleo estéril são métodos eficientes para conservação de fungos, assim como o método de repique contínuo, desde que este seja realizado em intervalos de tempo adequado, já que ambos os métodos foram capazes de manter a morfologia, viabilidade e virulência do isolado fúngico Bb02.

Referências Bibliográficas

- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de Micro-organismos: Revisão. **Revista de Microbiologia**, v.22, p. 263-268, 1991.
- DE HOOG, G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, n.1, p.1-41, 1972.
- FERNANDES, E. K. K. **Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus***. 2007. 130p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Seropédica. 2007.
- FINATTI, D.; APARECIDO, C. C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 715-720, 2009.
- REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, p. 1055-1073, 2011.
- PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo". **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.