

7-1-2002

Preservação de micélio de *Batkoa* sp. E. *Furia* sp. (Entomophthorales) em combinação com dessecantes e rudutores de oxigênio

Luis G. Leite

Sérgio B. Alves

Antonio Batista Filho

J. E. M. Almeida

Donald W. Roberts
Utah State University

Follow this and additional works at: https://digitalcommons.usu.edu/biology_facpub

 Part of the [Biology Commons](#)

Recommended Citation

Leite, L.G., S.B. Alves, A. Batista Filho, J.E.M. Almeida and D.W. Roberts. 2002. Preservação de micélio de *Batkoa* sp. E. *Furia* sp. (Entomophthorales) em combinação com dessecantes e rudutores de oxigênio. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*. 69(3): 117-122.

This Article is brought to you for free and open access by the Biology at DigitalCommons@USU. It has been accepted for inclusion in Biology Faculty Publications by an authorized administrator of DigitalCommons@USU. For more information, please contact dylan.burns@usu.edu.



COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

PRESERVAÇÃO DE MICÉLIO DE *BATKOA* SP. E *FURIA* SP. (ENTOMOPHTHORALES) EM COMBINAÇÃO COM DESSECANTES E REDUTORES DE OXIGÊNIO

L.G. Leite^{1,3}, S.B. Alves², A. Batista Filho¹, J.E.M. Almeida¹, D.W. Roberts³

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, CP 70, CEP 13001-970, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

A formulação de Entomophthorales é a etapa mais difícil no seu desenvolvimento como biopesticidas. Isso tem dificultado a avaliação da potência biológica de *Batkoa* sp. e *Furia* sp. no controle dos cercopídeos *Mahanarva fimbriolata* e *Deois schach*, pragas da cana-de-açúcar e das pastagens. Uma técnica de produção de micélio seco de Entomophthorales foi desenvolvida para permitir o uso desses fungos, no entanto, com resultados pouco satisfatórios quanto a preservação dos patógenos. Devido a essas dificuldades, realizou-se este estudo visando avaliar o efeito da combinação de dessecantes (sílica e glicerol) com redutores de oxigênio (vácuo e Ageless® ZPT-200) na preservação de micélio seco dos fungos *Batkoa* sp. e *Furia* sp. A combinação de sílica + Ageless® prolonga a sobrevivência desses dois fungos formulados como micélio seco até 90 dias, armazenados a 3° C e 23° C. O uso de vácuo como redutor de oxigênio não prolonga a sobrevivência desses fungos, mesmo em associação com dessecantes. A temperatura de 3° C provoca uma ligeira queda no potencial de crescimento de *Batkoa* sp., porém prolonga a sobrevivência do fungo até 90 dias, independentemente do tratamento.

PALAVRAS-CHAVE: Entomophthorales, *Batkoa* sp., *Furia* sp., formulação, cigarrinhas das pastagens, *Mahanarva fimbriolata*, *Deois* spp.

ABSTRACT

PRESERVATION OF *BATKOA* SP. AND *FURIA* SP. (ENTOMOPHTHORALES) DRY MYCELIUM WITH COMBINATIONS OF DESICCANTS AND OXYGEN REDUCERS. Formulation is the most difficult part of Entomophthorales development as biopesticides and bioacaricides, and has caused difficulty in evaluating the *Batkoasp.* and *Furiasp.* for the control of the cercopids *Mahanarva fimbriolata* and *Deois schach*, pests of sugar-cane and pastures. A technique for producing dry mycelium of Entomophthorales was previously developed to allow for field use of these fungi, but pathogen preservation (shelf life) was not satisfactory. Due to these difficulties, the research reported here aimed to evaluate the effect of combinations of two desiccants (silica and glycerol) with two oxygen reducers (vacuum and Ageless® ZPT-200) on the preservation of dry mycelium of *Batkoa* sp. and *Furia* sp. under temperatures of 3° C and 23° C. The combination of silica + Ageless® extends the survival of these two fungi formulated as dry mycelium for 90 days, stored at 3° C and 23° C. The use of vacuum to reduce oxygen does not extend the survival of these fungi, even in association with desiccants. Storage at 3° C causes a slight decrease in growth potential of *Batkoa* sp., but it extends fungus survival for 90 days, independent of other treatments.

KEY WORDS: Entomophthorales, *Batkoasp.*, *Furiasp.*, formulation, spittlebugs, *Mahanarva fimbriolata*, *Deois* spp., pasture.

A formulação de Entomophthorales é a etapa mais difícil no seu desenvolvimento como biopesticidas. Isso tem dificultado a avaliação da potência biológica de *Batkoa* sp. e *Furia* sp. no controle dos cercopídeos *Mahanarva fimbriolata* (Fabr., 1787) e *Deois schach* (Fabr., 1787), pragas da cana-de-açúcar e das pastagens.

Para alguns fungos, foram desenvolvidas metodologias de formulação de esporos de resistência na fase de pré-esporo ou esporo, antes ou após a quebra de dormência, misturando essas estruturas com argila, diluentes e agentes molhantes e dispersantes (LATGÉ & PERRY, 1980; SOPER & WARD,

²Departamento de Entomologia e Fitopatologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

³Department of Biology, Utah State University, Logan, UT, USA.

1982). No entanto, para vários outros fungos como *Batkoa* sp. e *Furia* sp., não se conhece ainda técnicas de produção de esporos de resistência, o que levou McCABE & SOPER (1985) a desenvolver uma técnica de produção de micélio seco de Entomophthorales. Uma solução de maltose (10%), pulverizada sobre o micélio fresco, forneceu proteção ao fungo durante o processo de secagem. Os resultados de preservação desses patógenos obtidos com esses estudos foram poucos satisfatórios.

O micélio seco de *Zoophthora radicans* tratado com maltose e armazenado a 4° C manteve boa viabilidade por 80 dias em pesquisa realizada por PELL *et al.* (1993) e 7 dias por PELL *et al.* (1998). Essa preservação foi inferior quando o micélio seco foi quebrado em pequenos grânulos e acondicionado a -20° C após a secagem do fungo. Mais recentemente, verificou-se que o armazenamento de conídios de *Metarhizium anisopliae* em condições de baixa umidade e ausência de oxigênio, reduziu significativamente o metabolismo do patógeno, permitindo a preservação por longo período, mesmo em temperatura ambiente (JIN *et al.*, 1999).

Devido a essas dificuldades, realizou-se esse estudo, visando avaliar o efeito da combinação de dessecantes com redutores de oxigênio na preservação de micélio seco dos fungos *Batkoa* sp. e *Furia* sp.

O trabalho foi realizado no laboratório de patologia de insetos do Departamento de Biologia da Utah State University, Logan, Utah, EUA. Os fungos foram avaliados na forma de grânulos de micélio, sendo obtidos de colônias desenvolvidas em meio de cultura sólido (extrato de levedura - 1% + glucose - 2%), após o corte do micélio (crescido na superfície) em porções de 0,8 x 0,8 cm. As porções de micélio foram extraídas, separadas do meio sólido e distribuídas sobre papel de filtro seco e estéril, dentro de placas de Petri de 3,0 cm de diâmetro, utilizando-se 5 porções de micélio para cada placa.

As placas foram seladas com filme de PVC e mantidas em sala sob temperatura de 23° C, no escuro, onde permaneceram durante 24 horas para *Furia* sp. e 48 horas para *Batkoa* sp. O papel de filtro absorveu o excesso de umidade dos pedaços de micélio, estimulando os fungos a crescerem com maior intensidade. Conseqüentemente, obteve-se no final desse período de 24 ou 48 horas de incubação, um abundante crescimento micelial com produção de esporos.

Após esse período, os filmes de PVC foram retirados, expondo as placas ainda tampadas a umidade de 32% pelo período de 1 ou 2 dias até que a água dentro das placas evaporasse para o ambiente externo, através das pequenas aberturas da tampa, com redução na umidade do fungo para menos de 32%.

As placas contendo os pedaços de micélio seco foram então acondicionadas nas temperaturas de 3° C

(geladeira) e 23° C (ambiente), após serem embaladas sob 8 condições envolvendo diferentes atmosferas e umidades: a) sob vácuo; b) sob vácuo, juntamente com o dessecante glicerol; c) sob vácuo, com glicerol mais um absorvente de oxigênio; d) sob vácuo, com o dessecante sílica; e) sob vácuo, com sílica mais um absorvente de oxigênio; f) sob pressão ambiente, com glicerol; g) sob pressão ambiente, com sílica; h) sob pressão e umidade ambiente (testemunha).

As placas de cada tratamento foram dispostas uma ao lado da outra sobre a tampa invertida de uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro. Para os tratamentos com vácuo, o conjunto foi colocado dentro de um saco plástico de 15 x 19 cm, revestido de nylon, e submetido ao processo de vácuo, utilizado um aparelho doméstico, "Food Saver®". Foi utilizado o absorvente de oxigênio Ageless®, tipo ZPT 200, o qual tem uma capacidade de absorção de 1,5 litros de oxigênio para cada envelope (5,5 x 6,0 cm).

Para os tratamentos com dessecantes, foi utilizado papel de filtro (9 cm de diâmetro) umedecido com 2 mL de glicerol, colocado sob o suporte das placas contendo micélio seco, ou 8 g de sílica distribuída ao redor das mesmas. Para os tratamentos com absorvente de oxigênio, cada conjunto de placa foi embalado juntamente com um pequeno envelope de Ageless® estendido sobre suas tampas. Para a testemunha, o conjunto foi apenas coberto com a mesma tampa usada para a base e, em seguida, selado com filme PVC.

Realizou-se uma avaliação antes do início do experimento e aos 10, 30 e 60 dias após a primeira. A avaliação constituiu-se da retirada dos pedaços de micélio seco de cada placa, seguido da distribuição dos mesmos sobre meio sólido (extrato de levedura - 1% + glucose - 2%) em placa de Petri de 10,0 cm de diâmetro. O fungo foi mantido sob 23° C, no escuro, e avaliado quanto a viabilidade e crescimento (diâmetro de colônia) aos 6 dias para *Furia* sp. e 10 dias para *Batkoa* sp., após sua inoculação no meio

Os experimentos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na primeira fase do experimento (Tabelas 1 e 2), a combinação Vácuo+Sílica+Ageless proporcionou a melhor preservação dos fungos nas duas temperaturas. Esse tratamento foi o único a permitir a sobrevivência dos fungos até 90 dias a 23° C, mantendo 100% da viabilidade, com redução nos diâmetros de colônia de 38,5% para *Batkoa* sp. e 11,5% para *Furia* sp. comparados com aqueles iniciais, porém sem diferença significativa (*Batkoa* sp.: $F = 9,718$; $P = 0,0001$. *Furia* sp.: $F = 50,971$; $P = 0,0001$).

Em condições de geladeira, houve uma queda na viabilidade e potencial de crescimento de *Batkoa* sp. já a partir do 10º dia de armazenamento independentemente do tratamento (Tabela 3). Por outro

lado, o ambiente de geladeira contribuiu para prolongar a sobrevivência do patógeno até 90 dias em todos os tratamentos, porém, com redução significativa em alguns deles quanto a viabilidade ($F = 4,491$; $P = 0,0001$) e potencial de crescimento ($F = 9,718$; $P = 0,0001$).

Para *Furia* sp. (Tabela 4), as condições em geladeira causaram a inviabilização do patógeno em alguns tratamentos aos 90 dias da avaliação mas mantiveram o fungo vivo em outros além do tratamento Vácuo+Sílica+Ageless. Esse tratamento proporcionou a melhor preservação também em geladeira, mantendo 100% da viabilidade dos grânulos de micélio seco aos 90 dias, sem afetar significativamente o potencial de crescimento ($F = 50,971$; $P = 0,0001$).

Na segunda fase do experimento (Tabelas 3 e 4), o tratamento Vácuo+Sílica + Ageless teve eficiência semelhante à Sílica + Ageless para a preservação dos fungos nas duas temperaturas, com os dois tratamentos mantendo a viabilidade dos patógenos acima de 86% até 90 dias, sem afetar o potencial de seu crescimento, exceto para *Furia* sp. acondicionado a 3 °C, com redução no crescimento de até 45%, embora não houve diferença significativa (*Batkoa* sp.: $F = 54,449$; $P = 0,0001$. *Furia* sp.: $F = 10,145$; $P = 0,0001$).

Condições de prateleira - A combinação Sílica+Ageless, com ou sem vácuo, contribuiu para a preservação desses fungos. Conídios de *Beauveria bassiana* M. *anisopliae* armazenados em um ambiente com baixa concentração de oxigênio e baixa umidade relativa (0-10%) foram preservados por longo período em condições de prateleira. Nessas condições, o fungo permanece em estado de dormência com baixa atividade fisiológica, suportando temperaturas de até 37° C. Para *M. anisopliae*, a preservação só foi possível enxarcando os conídios, previamente, com 0,05% do surfactante álcool tridecil etoxilado. Esse surfactante reduz a elevada tensão superficial do conídio, acentuada ainda mais pela secagem, permitindo a rehidratação e germinação do fungo depois de misturado em água. Micélios desses fungos são geralmente mais tolerantes ao processo de secagem do que conídios. No entanto, formulações de micélio seco têm demonstrado instabilidade sob altas temperaturas e limitadas aplicações no controle de pragas (JIN *et al.*, 1999).

A queda na sobrevivência de *Batkoasp.* e *Furiasp.* pode ser devido ao aumento da umidade ao redor das estruturas dos patógenos, comprovado pela mudança de coloração dos grânulos de sílica indicadora, passando do azul no início do experimento para cor-de-rosa no final, enquanto que no tratamento contendo somente sílica a coloração do dessecante manteve-se inalterada. Isso foi causado, provavel-

mente, pela água liberada do absorvente de oxigênio conforme o produto reagia com a atmosfera ao longo do tempo. O ingrediente ativo do Ageless é um óxido de ferro com elevado poder de ação, transformando-se em hidróxidos de ferro após a absorção de oxigênio. Em um compartimento selado, Ageless reduz o oxigênio para 0,01% (100ppm) ou menos.

Portanto, a morte do fungo ocorreu, provavelmente, pela sua reativação nas condições de umidade elevada, e pela ausência de oxigênio para o seu desenvolvimento. O absorvente de oxigênio foi avaliado, previamente, como único componente para a preservação do fungo, mostrando-se altamente deletério ao patógeno. O oxigênio é exigido pelos fungos para o funcionamento de algumas enzimas oxidases ou monoxidases, responsáveis por algumas reações de hidrólises necessárias para a biossíntese do esterol e do ácido graxo insaturado durante o crescimento do patógeno (GRIFFIN, 1993).

Para *Z. radicans*, o micélio seco tem sido uma das formas possíveis de serem utilizadas em formulações para o controle biológico de pragas. Esse fungo possui uma proteção natural contra a dessecação, proporcionada por uma mucilagem viscosa secretada sobre os conidióforos durante a sua formação, a qual atua também como meio higroscópico que ajuda a manter a pressão de turgor das hifas em crescimento ou como seu lubrificante (LI *et al.*, 1993). Apesar disso, esse fungo não apresenta a mesma resistência ao processo de secagem, nem a mesma estabilidade em baixas porcentagens de umidade como os hifomicetos, o que tem dificultado a avaliação do potencial de uso desse patógeno (PELL *et al.*, 1993; PELL *et al.*, 1998).

Nesse experimento, a secagem não afetou a viabilidade devido ao lento processo de desidratação dentro das placas de Petri, com o auxílio do papel de filtro absorvendo o excesso de meio. Também, o meio de cultura retirado juntamente com o patógeno, permitiu seu maior crescimento no início da secagem, protegendo-o contra esse processo pela atuação, principalmente, do açúcar presente no substrato. Esse processo de secagem aproxima-se mais das condições naturais, já que o fungo sobre o hospedeiro é seco juntamente com o substrato.

O micélio de Entomophthorales pode ser induzido a um estado de dormência com a secagem, mantendo-se, no entanto, com atividade fisiológica, provavelmente alta para sua preservação já que a taxa de respiração do micélio é maior que a de conídios (GRIFFIN, 1993). Portanto, o acondicionamento de micélio seco em condições de reduzida concentração de oxigênio além de baixa umidade, provavelmente, reduz a atividade fisiológica, contribuindo para a preservação do patógeno conforme se verificou no experimento.

Tabela 1 – Viabilidade e crescimento de *Batkoa* sp. em meio sólido, após diferentes períodos de armazenamento do fungo na forma micélio seco, a 23° C e 3° C, embalado em diferentes combinações envolvendo vácuo (V), glicerol (G), sílica (S), Ageless (A) e testemunha (T). *Colônias originadas de grânulos de micélio seco após 6 dias de crescimento.

Tratamentos	Avaliação inicial	23° C			3° C			
		10 dias	30 dias	90 dias	10 dias	30 dias	90 dias	
Viabilidade de micélio seco (%)	T	100 a	100 a	86,7 ab	0 b	33,3 ab	86,7 ab	60 ab
	V	100 a	100 a	93,3 a	0 b	53,3 ab	100 a	73,3 ab
	G	100 a	93,3 a	93,3 a	0 b	53,3 ab	80 ab	73,3 ab
	S	100 a	93,3 a	93,3 a	0 b	53,3 ab	80 ab	66,7 ab
	VG	100 a	66,7 ab	80 ab	0 b	80 ab	26,7 ab	33,3 ab
	VS	100 a	100 a	46,7 ab	0 b	40 ab	33,3 ab	60 ab
	VGA	100 a	100 a	80 ab	0 b	46,7 ab	20 ab	13,3 ab
	VSA	100 a	100 a	40 ab	86,7 ab	100 a	53,3 ab	86,7 ab
Diâmetro de colônias (mm)*	T	23,1 abc	27 ab	2,1 efg	0 g	15,9 abcdefg	6 defg	3,8 defg
	V	23,1 abc	28,7 a	4,7 defg	0 g	13,4 abcdefg	13,2 abcdefg	8,5 cdefg
	G	23,1 abc	12,7 abcdefg	3,8 defg	0 g	17,7 abcdef	7,2 cdefg	7,1 cdefg
	S	23,1 abc	11,4 bcdefg	7,3 cdefg	0 g	6,6 cdefg	7,3 cdefg	5 defg
	VG	23,1 abc	15,2 abcdefg	11,1 bcdefg	0 g	7,7 cdefg	1,5 efg	2,9 efg
	VS	23,1 abc	18,5 abcde	4,4 defg	0 g	3,7 defg	2,5 efg	4,4 defg
	VGA	23,1 abc	26,2 ab	3,7 defg	0 g	13 abcdefg	2,2 efg	0,7 fg
	VSA	23,1 abc	28,9 a	20,7 abcd	11,3 bcdefg	4,7 defg	4,8 defg	8,6 cdefg

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 2 – Viabilidade e crescimento de *Furia* sp. em meio sólido, após diferentes períodos de armazenamento do fungo na forma micélio seco, a 23° C e 3° C, embalado em diferentes combinações envolvendo vácuo (V), glicerol (G), sílica (S), Ageless (A) e testemunha (T). *Colônias originadas de grânulos de micélio seco após 6 dias de crescimento.

Tratamentos	Avaliação inicial	23° C			3° C			
		10 dias	30 dias	90 dias	10 dias	30 dias	90 dias	
Viabilidade de micélio seco (%)	T	100 a	100 a	0 c	0 c	100 a	86,7 a	0 c
	V	100 a	100 a	0 c	0 c	100 a	100 a	6,7 c
	G	100 a	100 a	6,7 c	0 c	100 a	93,3 a	0 c
	S	100 a	100 a	26,7 cb	0 c	100 a	100 a	0 c
	VG	100 a	100 a	33,3 b	0 c	100 a	100 a	33,3 b
	VS	100 a	100 a	100 a	0 c	100 a	100 a	13,3 bc
	VGA	100 a	100 a	0 c	0 c	100 a	100 a	26,7 b
	VSA	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Diâmetro de colônias (mm)*	T	20,9 bcdefg	18,5 cdefgh	0 j	0 j	24,9 abcde	10,0 hij	0 j
	V	23,1 abc	28,7 a	0 j	0 j	9,6 j	16,6 efgh	0,5 j
	G	23,1 abc	12,7 abcdefg	0,5 j	0 j	28,9 abcd	19,1 cdefgh	0 j
	S	23,1 abc	11,4 bcdefg	1,6 j	0 j	24,1 abcdef	10,7 ghij	0 j
	VG	23,1 abc	15,2 abcdefg	2,6 ij	0 j	27,5 abcd	19,7 cdefgh	2,3 j
	VS	23,1 abc	18,5 abcde	19,1 cdefgh	0 j	18,9 cdefgh	13,4 fghi	0,7 j
	VGA	23,1 abc	26,2 ab	0 j	0 j	23,1 abcdef	16,5 efgh	1,7 j
	VSA	23,1 abc	28,9 a	24,7 abcde	18,5 cdefgh	27,6 abcd	18,1 defgh	15,7 efg

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 4 - Viabilidade e crescimento *Batkoa* sp. em meio sólido, após 90 dias de armazenamento do fungo na forma de micélio seco, a 23° C e 3° C, embalado em diferentes combinações envolvendo vácuo (V), sílica (S), Ageless (A) e testemunha (T). *Colônia originada de grânulos de micélio seco após 6 dias de crescimento.

Temperatura	Tratamento	Viabilidade (%)		Diâmetro de colônia (mm)	
		Inicial	Após 90 dias	Inicial	Após 90 dias
23° C	VSA	100	100	14,8 b	20,3 ab
	SA	100	100	14,8 b	21,8 a
	T	100	100	14,8 b	0 c
3° C	VSA	100	100	14,8 b	21,9 a
	SA	100	100	14,8 b	19,4 ab
	T	100	100	14,8 b	0 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 4 - Viabilidade e crescimento *Furiasp.* em meio sólido, após 90 dias de armazenamento do fungo na forma de micélio seco, a 23° C e 3° C, embalado em diferentes combinações envolvendo vácuo (V), sílica (S), Ageless (A) e testemunha (T). *Colônia originada de grânulos de micélio seco após 6 dias de crescimento.

Temperatura	Tratamento	Viabilidade (%)		Diâmetro de colônia (mm)	
		Inicial	Após 90 dias	Inicial	Após 90 dias
23° C	VSA	100	86,7	8,4 a	8,1 a
	SA	100	100	8,4 a	10,6 a
	T	100	0	8,4 a	0 b
3° C	VSA	100	86,7	8,4 a	5,3 ab
	SA	100	86,7	8,4 a	4,6 ab
	T	100	0	8,4 a	0 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

O uso de vácuo como redutor de oxigênio não prolongou a sobrevivência dos fungos até 90 dias mesmo em associação com sílica, sugerindo que o vácuo não retira ar suficiente para manter o estado de dormência. Não há necessidade do uso de vácuo para a preservação desses Entomophthorales quando se utiliza a combinação de Sílica+Ageless (Tabelas 3 e 4). Também, o dessecante glicerol não prolongou a sobrevivência devido, provavelmente, a sua menor capacidade de absorção de umidade em relação a sílica.

Condições de geladeira - A geladeira acarretou uma ligeira queda na viabilidade e poder de crescimento do micélio de *Batkoa* sp. logo após o seu acondicionamento, mas prolongou a sobrevivência desse fungo até 90 dias, independentemente do tratamento, contribuindo também para a preservação de *Furiasp.* em alguns tratamentos (Vácuo, Vácuo + Glicerol, Vácuo + Sílica, Vácuo + Glicerol +Ageless, Vácuo+Sílica+Ageless). Não houve uma contribuição significativa dos dessecantes para a preservação

desses fungos em geladeira ou prateleira, exceto quando a sílica foi utilizada com Ageless. O acondicionamento de Entomophthorales em ambiente seco, dentro da geladeira, pode permitir a preservação desses fungos sobre o cadáver por até um ano. *Entomophaga aulicae* foi mantido por um mês no cadáver acondicionado em ambiente seco a 21° C, sobrevivendo por até 13 meses a 4° C ou freezer (TYRRELL, 1988). Condições de freezer também foram testadas com sucesso para a preservação de *Neozygites frezenii* (STEINKRAUS *et al.*, 1993).

Para micélio seco de *Batkoa* sp. e *Furia* sp., as condições de freezer foram deletérias, sugerindo que o fungo mantido sobre cadáveres pode ser mais resistente à dessecação em baixas temperaturas (PELL *et al.*, 1998) ou que o cadáver possa oferecer alguma proteção para essas condições. A resistência de Entomophthorales a baixas temperaturas também depende da espécie do patógeno. Assim, *Entomophthora aphidis* sobreviveu pelo período de 32 semanas a 0° C e 20° C ou 50% de umidade relativa em

cadáveres do afídeo *Acyrtosiphon pisum*, enquanto que *E. thaxteriana* manteve sua viabilidade por 16 semanas na temperatura de 10° C, a 20 ou 50% de umidade relativa (WILDING, 1973).

Em geral, o tratamento Sílica+Ageless contribuiu para a preservação de micélio seco de Entomophthorales em condições de geladeira e principalmente em prateleira. No entanto, o processo de secagem do fungo necessita ainda ser aprimorado. Sugerimos avaliar a preservação desses fungos após a sua secagem com e sem o substrato, comparando-se com a sua preservação sobre seus hospedeiros naturais.

Os ensaios e observações realizadas permitiram concluir que:

1. A combinação de sílica + Ageless® prolonga a sobrevivência desses dois fungos formulados como micélio seco até 90 dias, armazenados a 3° C e 23° C;
2. O uso de vácuo como redutor de oxigênio não prolonga a sobrevivência desses fungos, mesmo em associação com dessecantes;
3. A temperatura de 3° C provoca uma ligeira queda no potencial de crescimento de *Batkoa* sp., porém prolonga a sobrevivência do fungo até 90 dias independentemente do tratamento.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasília/Brasil pela bolsa de estudo "sandwich" concedida à L.G. Leite. Esse estudo foi financiado em parte pela Utah State University e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GRIFFIN, D.H. *Fungal physiology*. New York: Wiley-Liss, 1993. 458p.
- JIN, X.; GRIGAS, K.E.; JOHNSON, C.A.; PERRY, P.; MILLER, D.W. *Method for storing fungal conidia*. U.S. Patent 5, 989, 898 nov. 1999.

- LATGÉ, J.P. & PERRY, D.F. The utilization of an *Entomophthora obscura* resting spore preparation in biological control experiments against cereal aphids. *Bull. Org. Int. Lutte Biol. Sec. Rég. Ouest Palearctique*, v.3, n.4, p.19-25, 1980.
- LI, Z.; BUTT, T.M.; BECKETT, A.; WILDING, N. The structure of dry mycelia of the entomophthoralean fungi *Zoophthora radicans* and *Erynia neoaphidis* following different preparatory treatments. *Mycol. Res.*, v.97, p.1315-1323, 1993.
- MACCABE, D. & SOPER, R.S. *Preparation of an entomopathogenic fungal insect control agent*. U.S. Patent 4, 530, 834 jul. 1985.
- PELL, J.K.; MACAULEY, E.D.M.; WILDING, N. A pheromone trap for dispersal of the pathogen *Zoophthora radicans* Brefeld (Zygomycetes: Entomophthorales) amongst populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, v.3, p.315-320, 1993.
- PELL, J.K.; BARKER, A.D.P.; CLARK, S.J.; WILDING, N.; ALDERSON, P.G. Use of a novel sporulation and storage on conidiation by dried mycelia of the Entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans*. *Biocontrol Sci. Technol.*, v.8, p.13-21, 1998.
- SOPER, R.S. & WARD, M.G. Production formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAVIDAS, G.C. (Ed.) *Biological control in crop production*. New York: Allanheld & Osmun Publ., 1982. p.161-180.
- SEINKRAUS, D.C.; BOYS, G.O.; SLAYMAKER, P.H. Culture, storage and incubation period of *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygiteaceae) a pathogen of the cotton aphid. *Southwest. Entomol.*, v.18, n.3, p.197-202, 1993.
- TYRRELL, D. Survival of *Entomophaga aulicae* in dried insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, v.52, p.187-188, 1988.
- WILDING, N. The survival of *Entomophthora* spp. in mummified aphids at different temperatures and humidities. *J. Invertebr. Pathol.*, v.21, p.309-311, 1973.

Recebido em 5/2/02

Aceito em 22/7/02