

## **Criopreservação do nematóide *Deladenus (Beddingia) siricidicola***

**Caroline de Bastos Bühner**

Analista da Embrapa Florestas, Farmacêutica Industrial, caroline@cnpf.embrapa.br

**Susete do Rocio Chiarello Penteadó**

Pesquisador da Embrapa Florestas, Doutora em Ciências Biológicas (Entomologia),

susete@cnpf.embrapa.br

O armazenamento de microrganismos a temperaturas ultrabaixas preserva a viabilidade, pureza e estabilidade das cepas por períodos longos (20 anos ou mais). O método de conservação mais empregado é o nitrogênio líquido, que permite atingir temperaturas de até  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O objetivo deste trabalho foi implantar o método de criopreservação do nematóide *Deladenus (Beddingia) siricidicola*, assegurando a manutenção de suas características genéticas. Foram selecionadas culturas do fungo *Amylostereum areolatum* e do nematóide do isolado KC mantidas em meio BDA. As culturas foram cobertas com água destilada esterilizada e a solução foi transferida para proveta. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 1 mL que foi diluída 10 mil vezes para que fosse realizada, em lupa, a contagem do número de nematóides por mL. Em função desse valor, foi efetuado o cálculo do volume final para o qual a solução de nematóides foi aferida objetivando-se a quantidade de  $1.000\text{ nematóides mL}^{-1}$ . Posteriormente, a solução de nematóides foi preparada para que ficasse com 5% de glicerol e deixada em fluxo laminar até que o volume fosse reduzido e a solução final de nematóides estivesse com 60% de glicerol. O material foi transferido para criotubos e armazenado em botijão contendo nitrogênio líquido. Para o descongelamento foram testadas duas técnicas. Método 1: Os criotubos foram descongelados, transferindo-os para um banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 s e, em seguida, para câmara incubadora a  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 dias. Método 2: O material foi descongelado, transferindo-o para um banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 s, logo após, em cada criotubo, foi colocada Solução Ringer a  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  e esses foram colocados em câmara incubadora a  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 dias. Todos os nematóides descongelados pelo método 1 estavam mortos, pois apresentavam-se esticados ou com sua cutícula rompida. No método 2, os nematóides estavam com sua cutícula íntegra e haviam nematóides móveis.

**Palavras-chave:** Conservação; nitrogênio líquido; microrganismos entomopatogênicos.

