Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43
ISSN 1678-1961
Setembro, 2009

PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO MASSAL DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS
II - *Hirsutella thompsonii* (Fischer)

Embrapa

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1678-1961
Setembro, 2009

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43

Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos II - *Hirsutella thompsonii* (Fischer)

Francisco José dos Santos
Joana Maria Santos Ferreira
Victor José Oliveira Ribeiro
Ana Catarina Lima de Oliveira
Ana Gorete Campos de Azevedo

Aracaju, SE
2009

Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=fixas&pagina=publicacoesonline

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250, Aracaju, SE, CEP 49025-040
Caixa Postal 44
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.cpatc.embrapa.br
sac@cpatc.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ronaldo Souza Resende
Secretária-Executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Membros: Semíramis Rabelo Ramalho Ramos, Julio Roberto Araujo de Amorim, Ana da Silva Lédo, Flávia Karine Nunes Pithan, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Hymerson Costa Azevedo.

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Revisão Bibliográfica: Josete Cunha Melo
Tratamento de ilustrações: Sandra Helena dos Santos
Editoração eletrônica: Sandra Helena dos Santos
Foto da Capa: Joana Maria Santos Ferreira

1ª edição

Todos os direitos reservados.
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Protocolo para produção massal de fungos entomapatogênicos II – *Hirsutella thompsonii* (Fischer) / Francisco José dos Santos ... [et al.]. -- Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009.

22 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN1678-1961; 43).

Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=fixas&pagina=publicacoesonline

1. Fungo. 2. Produção de fungo. 3. Ácaro. 4. Santos, Francisco José dos. 5. Ferreira, Joana Maria Santos. 6. Ribeiro, Victor José Oliveira. 7. Oliveira, Ana Catarina Lima de. 8. Azevedo, Ana Gorete Campos de. I. Título. II. Série.

CDD 632.4

Sumário

Resumo 5

Abstract 7

Introdução 9

Técnicas de Produção Massal de *Hirsutella thompsonii* 11

1 - Coleta e transferência de material parasitado 11

2 - Isolamento e purificação do entomopatógeno 12

3 - Caracterização e conservação do isolado puro 13

4 - Preparo de culturas matrizes em meio sólido 14

5 - Preparo de culturas matrizes em meio líquido 15

6 - Produção massal de *H. thompsonii* 16

6.1 - Preparação do substrato sólido 16

6.2 - Inoculação do entomopatógeno no substrato sólido 16

7 - Rendimento médio de conídios de *H. thompsonii* produzido em substrato sólido 17

8 - Utilização da cultura de *H. thompsonii* 18

9 - Armazenamento da cultura de *H. thompsonii* em baixas temperaturas 18

10 - Controle de qualidade na produção de *H. thompsonii* 19

11 - Custo da produção massal de *H. thompsonii* 20

Organograma da produção do fungo 21

Referências Bibliográficas 22

Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos II - *Hirsutella thompsonii* (Fischer)

Francisco José dos Santos[1]
Joana Maria Santos Ferreira[2]
Victor José Oliveira Ribeiro[3]
Ana Catarina Lima de Oliveira[3]
Ana Gorete Campos de Azevedo [3]

Resumo

A técnica de produção massal de *Hirsutella thompsonii*, um fungo que provoca epizootias em populações naturais do ácaro da ferrugem dos citros *Phyllocoptruta oleivora* e da necrose dos frutos do coqueiro *Aceria guerreronis*, foi desenvolvida no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Cepas de *H. thompsonii* foram coletadas a partir de ambas espécies de ácaros no estado de Sergipe, Brasil. O principal objetivo da técnica é o de aumentar a quantidade da partícula infectiva (propágulo, esporo, conídios) do fungo, a fim de contribuir ainda mais para o estabelecimento de epizootias ou enzootias do entomopatógeno nas populações dos ácaros-alvo no campo. As seguintes etapas que envolvem a produção massal de *H. thompsonii* em substratos sólidos são agora discutidas: 1) coleta de ácaros encontrados parasitados do campo e isolamento através de sucessivas repicagens até a obtenção de isolados puros; 2) realização de bioensaios para comprovação da patogenicidade do isolado puro; 3) envio do isolado para identificação da espécie e conservação em Bancos de Microorganismos e nas Micotecas Locais;

[1] Químico, Lc., Analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira-Mar, 3250, Caixa Postal 44, CEP 49001-970, Aracaju, SE.
[2] Eng. Agrôn., M.Sc., Entomologia, Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira-Mar, 3250, Caixa Postal 44, CEP 49001-970, Aracaju, SE.
[3] Graduandos de Engenharia Agronômica, UFS/SE, Estagiários da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

4) obtenção de culturas monospóricas e preparação de matrizes em meios específicos, ricos em nutrientes; 5) produção massal propriamente dita, incluindo todos os detalhes e as fases envolvidas nessa tecnologia; e, 6) rendimento, utilização, controle de qualidade e custo da produção. Uma das etapas mais importante da produção massal de *H. thompsonii* é a inoculação do substrato sólido com uma suspensão de massa micelial obtida através de fermentação aeróbica, o que reduz o tempo de crescimento inicial do fungo, em média, de 10 a 15 dias para 3 a 5 dias. Esta técnica permite a obtenção de um rendimento superior de conídios, bem como, elimina os riscos de contaminação das culturas de *H. thompsonii*. A cultura do fungo está pronta para uso em bioensaios e em testes de campo após 15 a 20 dias da inoculação quando o fungo completa seu desenvolvimento no substrato.

Termos para indexação: *H. thompsonii*, entomopatógeno, produção massal, protocolo.

Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos II - *Hirsutella thompsonii* (Fischer)

Abstract

The mass production technique of *Hirsutella thompsonii*, a fungus which causes natural epizootics in populations of the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* and the coconut fruit mite *Aceria guerreronis*, was developed in the Biological Control Laboratory of Embrapa Coastal Tableland Research Center. Strains of *H. thompsonii* were collected from both mites species at Sergipe State, Brazil. The main purpose of the technique is to increase the amount of fungi infective particles (propagules, spores, conidia) in order to further contribute with the enzootics or epizootics establishment of the microorganisms in the natural target mite populations. The following steps involving the mass production of *H. thompsonii* on solid substrates are herewith discussed: 1) field collect of parasitized mites and isolation through successive medium passage until the attainment of pure strains; 2) the bioassays needed to prove strains pathogenicity to the target mite; 3) the pure strains submission for identification at species level, and then their maintenance in microorganisms banks and local fungi collections; 4) monospore cultures for mother cultures preparation using specific culture medium, rich in nutrients; 5) the fungus mass production itself, including all the details and the steps involved in this technology; and, 6) the yield, utilization, quality control and cost of production of *H. thompsonii* cultures. One of the most important steps in *H. thompsonii* mass production is the inoculation of the solid substrate (parboilized rice or corn grits) with a mycelium mass suspension obtained through aerobic fermentation, which

reduces the time of initial growth of the fungus, from 5-10 days to 3-5 days. This technique allows to obtain a higher conidia yield, and does eliminate the risk of contamination of *H. thompsonii* culture, as well. The fungus culture is ready to be used in bioassays or field tests from 15 to 20 days, when the total growth of the fungus are completed.

Index terms: *H. thompsonii*, entomopathogenous, mass production, protocol.

Introdução

O fungo entomopatogênico *Hirsutella thompsonii* Fischer, pertencente ao grupo dos fungos imperfeitos - Deuteromycotina:Hyphomycetes, é investigado pelo seu potencial como agente de controle microbiano para algumas espécies de ácaros de importância econômica, principalmente, os da necrose do fruto do coqueiro (*Aceria guerreronis e Amrineus cocofolius*) (FERREIRA et al., 2001) e o da falsa ferrugem dos citros (*Phyllocoptruta oleivora*) (CABRERA, 1977; GERSON; MUTTATH, 1979). Sua ocorrência é muito comum em áreas agrícolas e pode, além de ácaros e insetos infectados, também ser isolado de amostras de solo (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2001).

O laboratório de quarentena "Costa Lima" do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em Jaguariúna-SP tem contribuído para o desenvolvimento do controle biológico clássico, colaborando com instituições de pesquisas nacionais e internacionais no intercâmbio de microorganismos. No período de 1991 a 1996 introduziu no Brasil, isolados dos fungos entomopatogênicos (*Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* e *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa*), a pedido da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Joana M. S. Ferreira, comunicação pessoal), bem como, os antagonistas da família Moniliaceae (*Trichoderma harzianum* e *Gliocladium virens*) para testes de biocontrole de doenças de plantas (CNPMA, 2007).

Em Sergipe, os isolados foram estudados no laboratório de Controle Biológico da Embrapa Tabuleiros Costeiros sobre o ácaro *A. guerreronis*, obtendo-se em laboratório baixas taxas de parasitismo, sendo a maior (32,8%) com o isolado *H. thompsonii* var. *thompsonii* (HtMor), motivo pelo qual os isolados exóticos não foram liberados no campo. Procedeu-se então coletas em território brasileiro buscando encontrar isolados nativos de *Hirsutella* em fruto de coqueiro danificado pelo ácaro *A. guerreronis*. Isolados de *H. thompsonii* denominados HtBrI e HtBrA oriundos dos municípios de Itaporanga D'Ajuda, SE e Acajutiba-BA apresentaram, em testes de laboratório, taxas de parasitismo com 71,8% e 67,3%, respectivamente, confirmando seu potencial patogênico sobre esta espécie (FERREIRA et al., 2001). Estes autores relatam também a capacidade de parasitismo do isolado HtBrI sobre o ácaro-da-mancha-anelar, *Amrineus*

cocofolius em frutos do coqueiro (FERREIRA et al., 2001). Um novo isolado de *H. thompsonii* (HtBrPa) foi encontrado sobre o ácaro *A. guerreronis* no município de Moju-PA e outro sobre o ácaro da falsa ferrugem dos citros (*Phyllocoptruta oleivora*) no município de Umbaúba-SE, ambos, com patogenicidade comprovada em laboratório sobre o ácaro *A. guerreronis.*

Os fungos, para serem utilizados no controle microbiano de pragas como inseticidas biológicos, precisam ser manipulados em laboratório, testados quanto a sua eficiência e viabilidade e estar disponíveis em grandes quantidades. A necessidade de se produzir um microorganismo, comprovadamente patogênico e em larga escala, surge do desejo de utilizá-lo no campo como um bioinseticida, da mesma forma, como são usados os inseticidas organosintéticos.

Infelizmente, as grandes companhias comerciais relutam em disponibilizar recursos para estudos que envolvam os estágios iniciais de desenvolvimento de produtos biopesticidas. Em geral, esta etapa é conduzida em pequena escala nos laboratórios de pesquisas de instituições públicas ou departamentos de universidades para atendimento aos testes de laboratório e de campo (JENKINGS et al., 1998). A etapa seguinte diz respeito ao desenvolvimento de um sistema que produza não apenas conídios em quantidades suficientes para uso experimental, mas, em quantidade e com qualidade, de forma a permitir o estabelecimento do entomopatógeno na área e, conseqüentemente, a redução da população da praga-alvo. Paralelo ao processo de produção, se faz necessário o desenvolvimento de um rigoroso procedimento de controle de qualidade, o que permitirá acompanhar qualquer variação ou contaminação que possa ocorrer durante o armazenamento do produto.

Uma característica observada no Brasil, na maioria dos programas de P&D, é a falta de investimentos destinados à construção de um sistema de produção em escala comercial. Entretanto, isto não pode constituir-se em obstáculo para o sucesso de um programa de controle com biopesticidas, uma vez que, o desenvolvimento de um sistema de produção simples e confiável já mostra valor incalculável na definição dos parâmetros de produção (JENKINGS et al., 1998).

Isolados HtBrI, HtBrU e HrBrPa do fungo *H. thompsonii* são produzidos em larga escala na Embrapa Tabuleiros Costeiros. A grande finalidade da produção é a de aumentar a quantidade da partícula infectiva (propágulos, esporos ou conídios) e a de devolvê-la ao campo com vistas a provocar o estabelecimento enzoótico ou

epizoótico do entomopatógeno na população do hospedeiro (FERREIRA et al., 2002). Da mesma forma, como no protocolo do fungo *Beauveria bassiana* (FERREIRA, 2004) busca-se a obtenção de um produto com características específicas de pureza, abundancia em esporos, viabilidade após longo período de armazenamento, economia na produção, conveniência na utilização e transporte, facilidade de aplicação e eficiência no controle da praga-alvo.

Todas as etapas que envolvem a produção massal de *H. thompsonii* em substratos sólidos são agora discutidas.

TÉCNICAS DE PRODUÇÃO MASSAL DE *Hirsutella thompsonii*

1 - COLETA E TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL PARASITADO

No coqueiro as colônias do ácaro *Aceria guerreronis* ficam abrigadas e se desenvolvem na região tenra localizada sob as brácteas (região distal superior) dos frutos (Figura 1) dos cachos das folhas nº 12, 13 e 14 e nas plantas jovens nos folíolos das folhas novas. Na laranja, as colônias do ácaro-da-ferrugem *Phyllocoptruta oleivora* (Figura 2) se desenvolvem na superfície do fruto. Amostras com sintomas do dano da praga são coletadas no campo, e transferidas para o laboratório para serem submetidas a uma série de procedimentos.

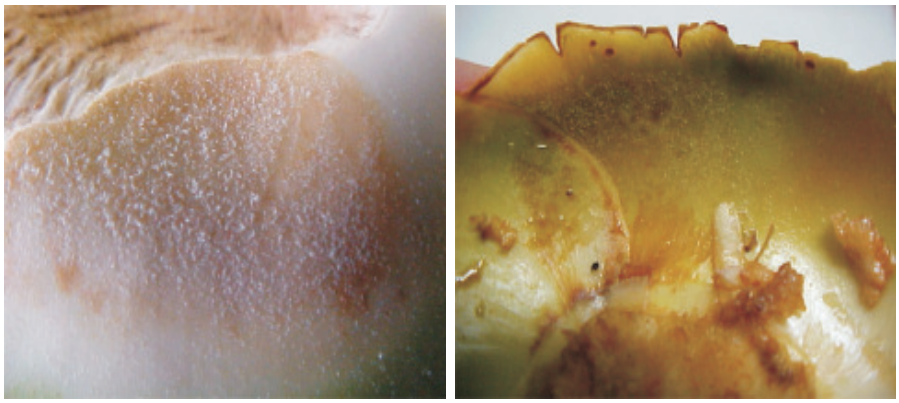


Figura 1 – Colônias do ácaro-da-necrose-do-coqueiro na região tenra da parte distal onde o fruto se prende à espigueta do cacho (a) protegida pelo perianto (b). Fotos: Joana M. S. Ferreira

Figura 2 – Ácaro-da-ferrugem-dos-citros *Phyllocoptruta oleivora* (a) e área do fruto danificada (b).
Foto: disponível em www.agrobite.com.br.

O material coletado deve ser cuidadosamente examinado em laboratório com o auxílio de uma binocular no aumento de 40x utilizando, de preferência, a luminosidade indireta da binocular para uma perfeita visualização do corpo sombreado do ácaro e das hifas do patógeno (Figura 3) saindo de seu corpo. Em estruturas vegetais cujos tecidos não podem ser seccionados a uma espessura mínima que permita a passagem da luminosidade indireta, como os frutos novos do coqueiro ou a casca rugosa e grossa da laranja, é possível utilizar a luminosidade superior. Neste caso, tem-se um pouco mais de dificuldade para visualizar e transferir o patógeno.

2 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO ENTOMOPATÓGENO

Encontrado um ácaro com inúmeras hifas saindo do seu corpo (Figura 3), faz-se a coleta do material parasitado mediante resgate individual transferindo-o, com o auxílio de um alfinete flambado, para meio de cultura BDA (batata, dextrose e agar) contendo antibiótico, para inibir qualquer contaminação bacteriana.

Os isolados são incubados por 8 a 10 dias em câmara B.O.D., a uma temperatura de 28°C ± 2°C .

Nesse período observa-se o crescimento do fungo e a presença de qualquer contaminação na placa, com o auxílio de um microscópio.

Em face da presença de impurezas no material proveniente do campo, é comum, nessa etapa, se fazer repicagens dos isolados em tubos e/ou placas com meio de cultura BDA, até a obtenção de isolados puros.

Com o isolado puro, procede-se sua repicagem para tubos ou placas com meio de cultura semi-sólido específico para *Hirsutella* (Peptona 0,5g; Dextrose 20g; Extrato de Levedura 5g; Sulfato de Magnésio 0,5g; Cloreto de Cálcio 0,01g; KH_2PO_4 1,5g; Agar 17g; Cloranfenicol 0,5g; e 1 litro de água destilada), a fim de se obter o crescimento completo do fungo.

A pureza total é obtida mediante o cultivo do isolado em colônias, originadas de um único conídio (esporo), a chamada 'cultura monospórica'. Para obtenção da cultura monospórica, conídeos são coletados de uma cultura pura e a seguir transferidos com o auxílio de uma alça de platina para placa de Petri com meio de cultura Agar-água. Após esse procedimento as placas são mantidas em B.O.D. por 24 horas quando são avaliadas para a coleta dos conídios isolados que apresentam emissão de tubos germinativos. Através de pequenos cortes feitos com um bisturi ao redor dos conídios selecionados, estes são transferidos para placas de Petri ou para tubos de ensaio com meio nutritivo para o desenvolvimento da cultura. Este é um procedimento simples e importante para assegurar a pureza e a virulência dos isolados.

3 - CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO ISOLADO PURO

A partir das culturas monospóricas, preparam-se lâminas para microcultura e por análise microscópica o fungo é caracterizado contando com o auxílio da chave de identificação de fungos. Para identificação ao nível de espécie, o material repicado é encaminhado para especialistas.

Todos os isolados, após serem caracterizados/identificados, são numerados, registrados na Micoteca da Unidade e conservados em geladeira. A cada seis meses são repicados em meio de cultura semi-sólido utilizando-se o meio específico de *Hirsutella*. Àqueles, comprovadamente patogênicos para as pragas do coqueiro são encaminhados para instituições que possuam um Banco de Microorganismos Entomopatogênicos onde serão numerados, registrados e conservados em Nitrogênio Líquido a – 180°C.

Periodicamente deve-se proceder ao revigoramento dos isolados de *H. thompsonii* através da inoculação sistemática do fungo sobre o hospedeiro. Esse procedimento é realizado a cada três passagens da cultura sobre o meio de cultura, o que assegura sua viabilidade e virulência.

4 - PREPARO DE CULTURAS MATRIZES EM MEIO SÓLIDO

As culturas matrizes são a fonte de inóculo utilizada na produção.

Estas devem, obrigatoriamente, ser advindas de isolamento monospórico com vistas a se obter cepas puras e virulentas de *H. thompsoni.*

Selecionadas as culturas com melhor desempenho em termos de velocidade de crescimento, massa fúngica e pureza estas são preparadas em suspensão (**suspensão 1**) para serem utilizadas, por sua vez, na preparação das culturas matrizes.

A **suspensão 1**, contendo aproximadamente $1x10^6$ conídios/mL, é preparada em câmara asséptica adicionando-se 5mL de água destilada/esterilizada com Tween 80 a 0,05%, ao tubo com a cultura agitando-o bem com o auxílio do agitador de tubos e/ou bastão de vidro esterilizado, para soltar os conídios do meio.

O meio de cultura é preparado em frascos erlenmeyers de 250mL (frasco-matriz) utilizando-se arroz parboilizado na proporção de 50g de arroz para 20mL de água destilada, deixados a seguir, em descanso por 30 minutos e com homogeneização para melhor absorção da água e autoclavados por 20 minutos a 1Kgf de pressão e 121° C de temperatura.

Em câmara asséptica, inocular a **suspensão 1** a cada frasco-matriz.

O crescimento da cultura no frasco-matriz se completa entre 10 e 15 dias, com temperatura de 28°C ± 2 °C, em BOD ou ambiente controlado

Selecionadas as matrizes com melhor desempenho em termos de velocidade de crescimento, massa fúngica e pureza estas são preparadas em suspensão (**suspensão 2**) para serem utilizadas, por sua vez, na produção massal do fungo

em substratos sólidos ou na preparação de matrizes em meio líquido.

A **suspensão 2**, contendo aproximadamente $1x10^6$ conídios/mL, é preparada em câmara asséptica adicionando-se 150mL de água destilada/esterilizada com Tween 80 a 0,05% ao frasco com a cultura matriz. Agita-se bem a mistura com um bastão de vidro e em seguida filtra-a com gaze, ambos esterilizados, para soltar os conídios do arroz.

5 - PREPARO DE CULTURAS MATRIZES EM MEIO LÍQUIDO

Preparar o meio líquido misturando 20g de levedura, 20g de glucose ou dextrose e 0,5g do antibiótico cloranfenicol em 1L de água destilada. Distribuir 75mL do meio em um frasco erlenmeyer de 250mL (frasco-matriz) e autoclavar por 20 minutos a 1Kgf de pressão e 121° C de temperatura.

Deixar o meio líquido esfriar, dentro da câmara asséptica. Inocular com o bico dosador cerca de 3 a 5mL da **suspensão 2**, contendo aproximadamente $1x10^6$ conídios/mL a cada frasco-matriz.

Transferir os frascos para um incubador/agitador orbital operando a 150rpm e temperatura de 28°C ± 2°C, por um período de três a cinco dias.

Ao final do processo, selecionar as matrizes com melhor desempenho em termos de crescimento micelial e pureza e na câmara asséptica preparar a suspensão que vai ser utilizada na produção massal do fungo adicionando em cada frasco água destilada/esterilizada na proporção 1:1 (**suspensão 3**). Agitar bem os frascos para homogeneização da massa micelial. Em média, o rendimento obtido para cada matriz com 75mL de meio líquido é de 2,475g de massa micelial.

Matrizes preparadas em meio líquido podem ser armazenadas no freezer (-18°C) até 4 meses e na geladeira (5°C) apenas 2 semanas originando culturas com viabilidade superior a 67%.

A produção do fungo *Hirsutella* a partir de matrizes preparadas em meio líquido apresenta como vantagens a redução do tempo de crescimento inicial do fungo, em média, de 5 a 10 dias para 3 a 5 dias, quando inoculado a partir de meio de

cultura sólido; a obtenção de um maior rendimento na produção de conídios; e a eliminação dos riscos de contaminação.

O meio específico para *Hirsutella* também pode ser usado como meio líquido, bastando para isso que se retire o Agar-agar, dentre os ingredientes.

6 – PRODUÇÃO MASSAL DE H. thompsonii

6.1 - PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO SÓLIDO

Colocar em sacos autoclaváveis de 2kg (polietileno ou polipropileno) 100g de arroz parboilizado e adicionar 40mL de água de torneira (água limpa). Deixar os sacos em repouso por 30 minutos para que o arroz absorva água, mexendo com freqüência para manter a homogeneização do substrato.

Arrumar o arroz no fundo do saco e dobrar várias vezes sobre si mesmo formando um rolo para melhor acomodação e rendimento na autoclave.

Proceder a esterilização do meio de cultura na autoclave durante 20 minutos a 1Kgf de pressão e 121°C de temperatura.

Após serem resfriados, os sacos com o meio de cultura são transferidos para a câmara de fluxo laminar esterilizada para serem inoculados.

6.2 - INOCULAÇÃO DO ENTOMOPATÓGENO NO SUBSTRATO SÓLIDO

Fazer a assepsia da câmara de fluxo laminar vertical e em seguida sua esterilização com a irradiação de uma lâmpada ultravioleta (UV), durante 30 minutos antes da inoculação.

No interior da câmara asséptica, abrir o saco de arroz autoclavado e proceder a inoculação do meio com a **suspensão 2 ou a 3** utilizando um frasco de 500mL acoplado a um bico dosador de 5mL. Nas inoculações com a suspensão 3 são inoculados em média 0,0825g de massa micelial por saco.

Fechar o saco plástico e misturar bem a solução fúngica ao arroz para se obter a maior homogeneidade possível.

Deixar um volume de ar no interior do saco plástico para se obter uma aeração que favoreça ao desenvolvimento do fungo.

Os sacos inoculados são transferidos para a sala de crescimento e distribuídos nas prateleiras, lado a lado e em posição deitada, até que fiquem totalmente cobertos com micélios/conídios (três a cinco dias). A sala de crescimento é mantida com fotoperíodo natural e temperatura em torno de 28°C ± 2 °C e UR de 75%.

Após três a cinco dias, fazer a homogeneização do substrato, arrumando os sacos lado a lado e em posição de pé, dessa feita, para permitir o crescimento uniforme do fungo em volta do grão de arroz e com isso obter um maior rendimento de conídios.

A medida que os sacos forem murchando proceder a oxigenação dos mesmos. Esta operação é feita a cada 5 a 7 dias abrindo-se e fechando-se os sacos em câmara asséptica para renovação do ar e retirada do excesso de CO_2 que inibe o desenvolvimento do fungo.

O crescimento do fungo se completa entre 15 e 20 dias, estando a cultura pronta para uso em bioensaios, em testes de campo ou para ser usada como inóculo para subseqüentes inoculações em meio sólido.

7 - RENDIMENTO MÉDIO DE CONÍDIOS DE H. thompsonii PRODUZIDO EM SUBSTRATO SÓLIDO

Após o atingimento de sua fase de maturação a cultura de *Hirsutella* pesa em média 150g por saco e produz em torno de 1×10^8 conídios/mL em suspensão preparada com 400 mL de água destilada com Tween 80 a 0,05%.

8 - UTILIZAÇÃO DA CULTURA DE H. thompsonii

Culturas em substrato sólido. Após atingir sua fase de maturação (15 a 20 dias) a cultura do fungo pode ser imediatamente utilizada em bioensaios ou em testes de campo. A utilização mais comum desse material no campo é em forma de ''suspensão aquosa''. No preparo da suspensão adicionar para cada 3 sacos da cultura crescida no arroz, um litro de água destilada e 0,5mL do dispersante Tween 80, quando se obtém em média, uma suspensão na concentração de 1x 10^8 conídios/mL.

Culturas em meio-líquido. Após três dias de agitação na mesa orbital a massa micelial formada está pronta para ser usada na produção massal, em bioensaios ou em testes de campo. Na produção massal faz-se a diluição da cultura em água destilada na proporção de 1:1 (processo já descrito). Já, nos bioensaios e testes de campo essa proporção pode variar de acordo com a praga-alvo.

9 – ARMAZENAMENTO DA CULTURA DE H. thompsonii EM BAIXAS TEMPERATURAS

Culturas em substrato sólido – O armazenamento da cultura de *Hirsutella* em baixas temperaturas (freezer) é fundamental para aumentar o seu tempo de uso. Para tanto, é necessário proceder antes, a secagem das culturas do fungo a serem armazenadas. Estas são transferidas para bandejas rasas ficando o material exposto por cerca de 3 a 5 dias, sob desumidificação e temperatura de 25°C ± 2°C. Reduzida a umidade da cultura de *H. thompsonii* para 9% a 10% de umidade o material é transferido para sacos de polietileno ou polipropileno de 1kg retirando-se o máximo de ar do interior dos sacos para melhor acomoda-los uns sobre os outros. Conídios de *Hirsutella* armazenados, nessas condições, a 5° C de temperatura por um período de até 1 ano é capaz de manter a viabilidade dos conídios acima de 80%, e armazenados até 3 anos a -18°C de temperatura a viabilidade dos conídios consegue ser mantida acima de 60%. Para utilização em bioensaios ou no campo, o material deve ser reumidificado adicionando-se para cada 300g da cultura seca um litro de água destilada e 0,5mL do dispersante Tween 80 para obtenção de uma suspensão na concentração equivalente a 1x 10^8 conídios/mL.

Culturas matrizes em meio-líquido – As matrizes de *Hirsutella* preparadas em meio líquido são usadas de imediato na inoculação de meios de cultura sólido, mas, podem ser conservadas no freezer (-18°C) até 4 meses e na geladeira (5 °C) por cerca de 2 semanas e produzir culturas viáveis.

Armazenamento da massa micelial a -18°C de temperatura – após 90 e 120 dias de congelamento e inoculada no meio de cultura sólido, conforme procedimentos já descritos, produz culturas de *H. thompsonii* com viabilidade dos conídios em torno de 73% e 68%, respectivamente, o que significa uma perda no poder germinativo de 12% e 17% em relação a taxa de germinação inicial (85%) da cultura. A produção de conídios permanece inalterada quando comparada a quantidade de conídios produzida em culturas novas com 15 a 20 dias de crescimento.

Armazenamento da massa micelial a 5 °C de temperatura – na primeira semana a perda no poder germinativo dos conídios foi de apenas 7%. Na segunda semana, entretanto, ocorreu perda conidial significativa o que inviabiliza o armazenamento da massa micelial nessas condições de temperatura e tempo.

Conídios liofilizados – Atualmente está sendo estudado o tempo de prateleira dos conídios liofilizados, partindo-se de uma solução concentrada submetida a 1m e –50°C. Os conídios liofilizados estão armazenados em condições de ambiente (±25°C), geladeira (±5°C) e freezer (-18°C).

10 - CONTROLE DE QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE H. thompsonii

Durante o período de armazenamento da cultura realizar análises periódicas nos lotes em estoque para acompanhar o rendimento do material produzido (conídios/g de arroz ou conídios/mL), a viabilidade dos conídios e o aparecimento de agentes contaminantes. Esse procedimento serve para avaliar a qualidade da produção ao final do processo, como segue:

Rendimento da produção – Fazer uma amostragem de forma aleatória dentro do lote, e equivalente a 2% do lote a ser avaliado. Preparar uma suspensão com 10 g da cultura (arroz com fungo), 200 ml de água destilada/esterilizada e 0,05% de Tween 80. A seguir proceder a uma diluição serial dessa suspensão até a 10^{-}

^{3} e com o auxílio de um microscópio estereoscópio e de uma câmara de contagem fazer a leitura do número de conídios na amostra, seguindo a metodologia proposta por (Alves et al, 1998) para estimativa da densidade de conídios (concentração).

Viabilidade dos conídios - Utilizar as mesmas amostras para estimar a viabilidade dos conídios armazenados. Nesse caso, espalhar na placa de Petri uma a três gotas da suspensão sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalsk, e deixar em incubação por um período de 24 horas em ambiente a 28°C ± 2 °C. Decorrido esse tempo, fazer a contagem do número de conídios germinados e não-germinados em 15 campos do microscópio a fim de estimar a taxa de germinação do lote ao longo do período de armazenamento. A viabilidade do lote deve ser superior a 85% no momento do armazenamento. Para realizar o teste de viabilidade dos conídios que foram armazenados secos, é importante colocá-los durante 2 horas em um ambiente com umidade relativa do ar saturada (acima de 80%), para que se recuperem do déficit hídrico a que foram submetidos e germinem normalmente.

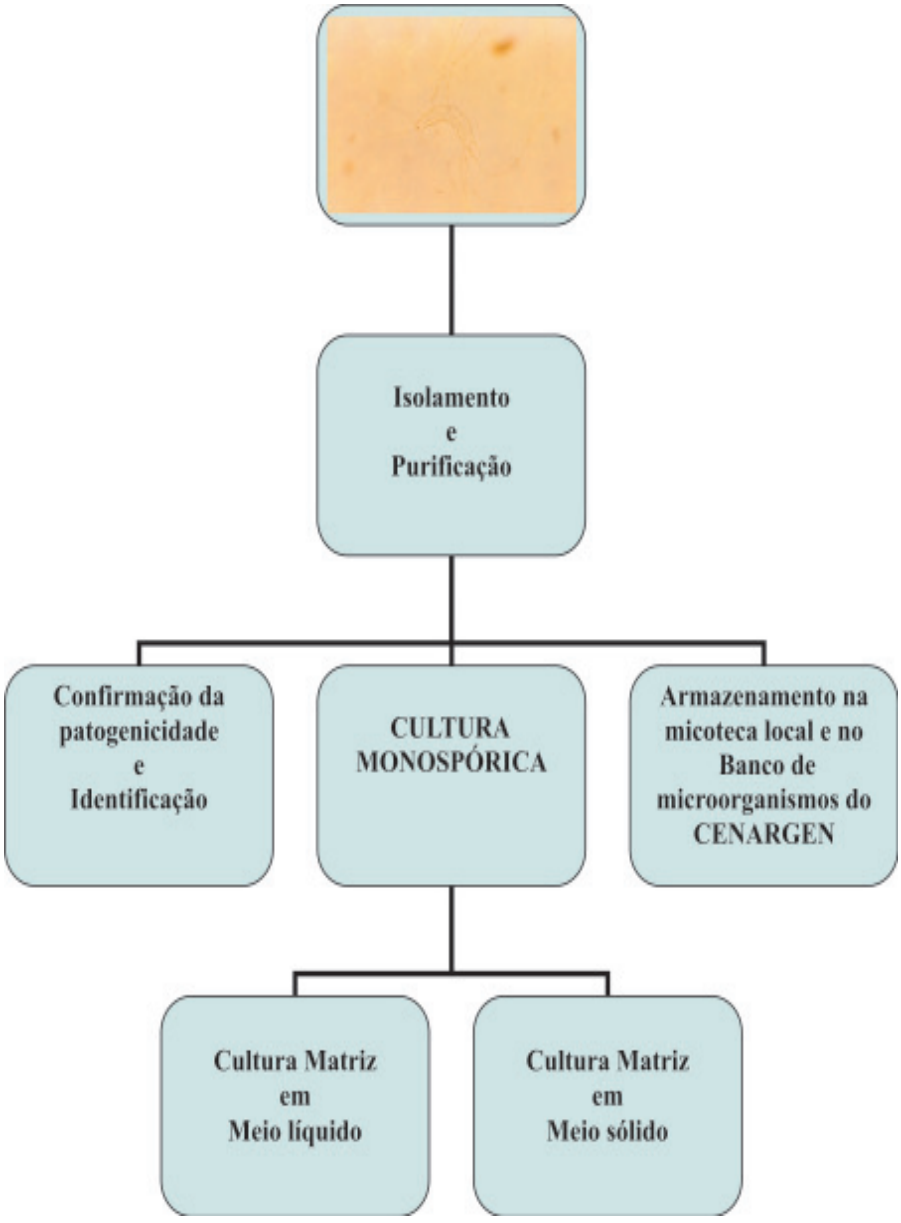
Contaminação – Verificar sempre a presença de contaminantes nas unidades dos lotes armazenados, como por exemplo, os fungos dos gêneros *Penicilium* e *Aspergillus*, bem como, as bactérias descartando-se todos àqueles com sinal de contaminação.

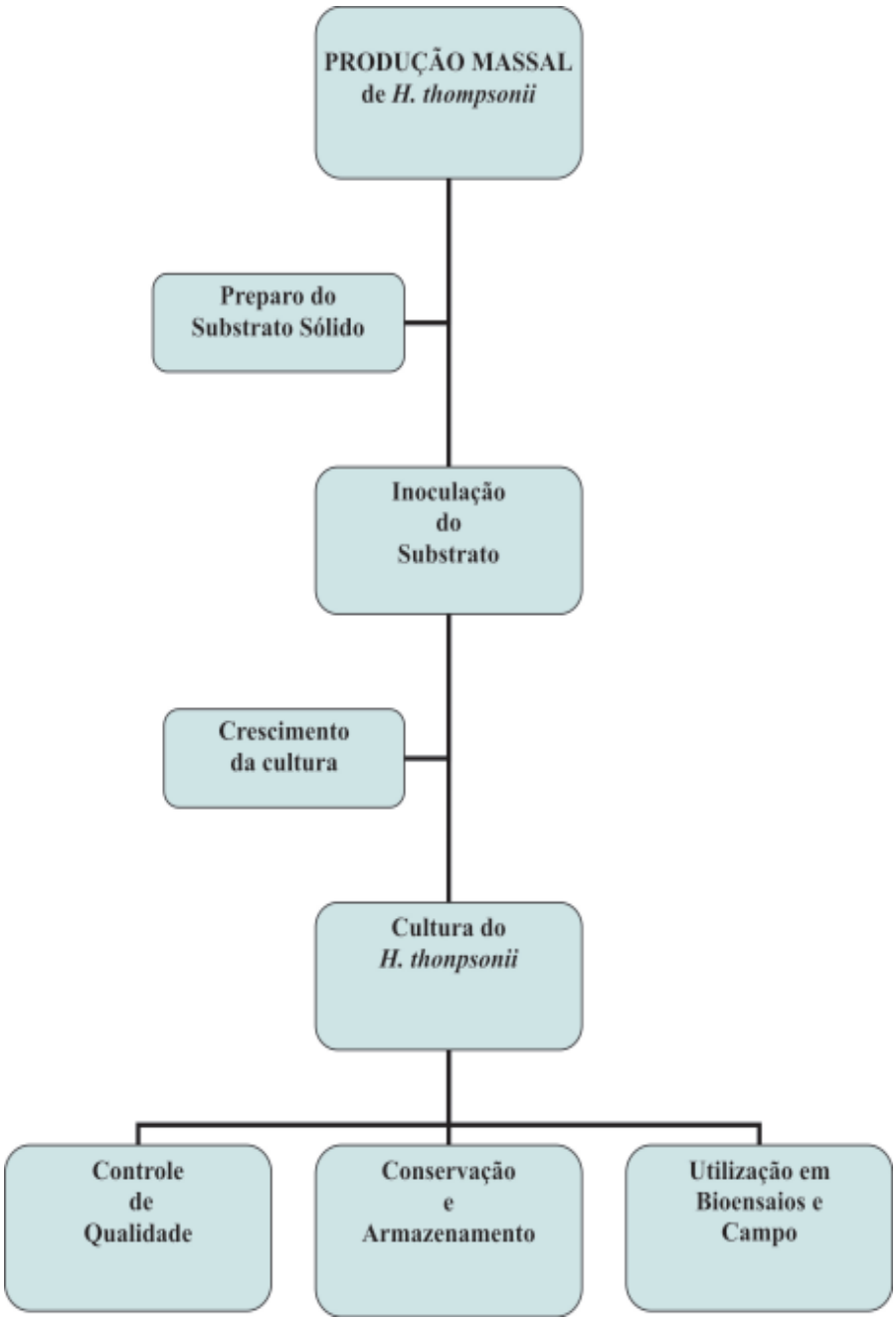
Revigoramento dos isolados – Como etapa obrigatória na produção de fungos entomopatogênios deve-se proceder a cada três sub-culturas (culturas produzidas seguidamente em substratos artificiais) o revigoramento dos isolados, mediante a passagem do patógeno sobre o inseto hospedeiro a fim de manter sua viabilidade e virulência.

11 - CUSTO DA PRODUÇÃO MASSAL DE H. thompsonii

O custo estimado de produção do fungo *Hirsutella* por quilograma de material produzido é de R$ 4,00 para o substrato úmido e de R$ 4,24 para o substrato seco.

ORGANOGRAMA DA PRODUÇÃO DO FUNGO




PRODUÇÃO MASSAL
de H. thompsonii
Preparo do
Substrato Sólido
Inoculação
do
Substrato
Crescimento
da cultura
Cultura do
H. thonpsonii
Controle
de
Qualidade
Conservação
e
Armazenamento
Utilização em
Bioensaios e
Campo

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, n. 20, p. 30-33, 2001.

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

CABRERA, R. I. Estudio em Cuba del *Hirsutella thompsonii* Fisher. Controle biológico del acaro del moho (*Phyllocoptruta oleivora* Ashm.). **Agrotecnia de Cuba**, La Habana, v. 9, n. 1, p. 3-11, 1977.

COSAVE: Comité de Sanidad Vegetal del Cone Sur. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/biocontrol/legislacao/cosave/labquaren.html> Acesso em: 13 de dezembro de 2007.

FERREIRA, J. M. S.; ARAÚJO, R. P. C. de; SARRO, F. B. **Perspectivas para o uso de fungos entomopatogênicos no controle microbiano das pragas do coqueiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 24 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 26).

FERREIRA, J. M. S. **Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos: I - Beauveria bassiana (Vuill.).** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004. 30 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 3).

GERSON, U.; MUTTATH, T. I. *Hirsutella thompsonii* a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions. **Annual Applied Biology**, Filandia, v. 91, p. 29-40, 1979.

JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; GEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, London, v. 19, p. 21-31, 1998.

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL