

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* E *Sporothrix insectorum*

Khesller Patrícia O. Name¹, Antônio Felipe G. Leite², Roberto Teixeira Alves³, Maria Alice S. Oliveira³,
Josefino de Freitas Fialho³, Marcos Rodrigues de Faria⁴ e Alba Rejane N. Farias⁵.

¹Estudante de Ciências Biológicas do UNICEUB e Bolsista da Embrapa Cerrados, BR 020 km 18, Planaltina, DF, CEP 73301-970

khesller@cpac.embrapa.br,

²Estudante de Agronomia da UPIS e Bolsista da Embrapa Cerrados, ³Pesquisadores da Embrapa Cerrados,

⁴Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e ⁵Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

INTRODUÇÃO

Produtos à base de fungos benéficos, utilizados no controle de insetos, são chamados de micoinseticidas e podem desempenhar importante papel em uma agricultura moderna e sustentável. Para tanto, é essencial que se amplie o conhecimento sobre esses fungos e também que se desenvolvam técnicas de produção, formulação e de aplicação apropriadas.

Muitos trabalhos sobre produção de fungos entomopatogênicos foram desenvolvidos no Brasil e no mundo (Alves, 1986; Aquino et al., 1975; Aquino et al., 1977; Goettel, 1994; Jenkins et al., 1998), porém o aprimoramento das técnicas de produção de fungos é uma necessidade constante, principalmente para as biofábricas envolvidas no assunto.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver estudos laboratoriais para aperfeiçoar e selecionar o método mais eficiente, dentre os testados, de produção dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Sporothrix insectorum*, em meio sólido, para futura utilização no controle biológico de *Vatiga illudens*, na cultura da mandioca.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o experimento de produção de esporos foram utilizados isolados dos fungos *Beauveria bassiana* de *Vatiga illudens*, *Metarhizium anisopliae* CG 49 e *Sporothrix insectorum* CG 422, sendo o primeiro pertencente à coleção da Embrapa Cerrados e os dois últimos à coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Todos foram previamente passados pelo percevejo-de-renda da mandioca, *V. illudens*.

Os fungos foram inicialmente cultivados em placas de Petri com BDA para a obtenção de esporos puros. A viabilidade mínima dos esporos aceitável para utilização no experimento foi de 80%. O meio sólido utilizado foi o arroz parboilizado em sacos plásticos de polipropileno onde se acrescentou água. Autoclavou-se o material e após o resfriamento inoculou-se 20 ml de uma suspensão contendo 1×10^7 esporos/ml de cada fungo, de acordo com os diferentes tratamentos.

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 6, com 18 tratamentos e 4 repetições, conforme o esquema a seguir:

- "Tratamentos 1, 2 e 3 para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *S. insectorum*, respectivamente: Sacos plásticos com 250g de arroz, com 35% de água (87,5 ml de água) sem deixar de molho e autoclavados durante 50 minutos.

- "Tratamentos 4, 5 e 6 para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *S. insectorum*, respectivamente: Sacos plásticos com 250g de arroz, com 80% de água (200 ml) deixando de molho por 30 minutos e autoclavados durante 20 minutos.
- "Tratamentos 7, 8 e 9 para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *S. insectorum*, respectivamente: Sacos plásticos com 250g de arroz, com 35% de água (87,5 ml) deixando de molho por 30 minutos e autoclavados durante 20 minutos.
- "Tratamentos 10, 11 e 12 para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *S. insectorum*, respectivamente: Sacos plásticos com 250g de arroz, com 80% de água (200 ml) sem deixar de molho e autoclavados durante 50 minutos.
- "Tratamentos 13, 14 e 15 para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *S. insectorum*, respectivamente: Sacos plásticos com 250g de arroz, que antes foram deixados de molho em uma bandeja com água abundante por 30 minutos e posteriormente autoclavados durante 30 minutos.
- "Tratamentos 16, 17 e 18 para *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *S. insectorum*, respectivamente: Bandejas metálicas, envolvidas por sacos plásticos, contendo 250g de arroz, que antes foram deixados de molho em uma bandeja com água abundante por 30 minutos e posteriormente autoclavados durante 30 minutos.

Esses sacos plásticos e bandejas foram incubados a 25 °C durante onze dias para o desenvolvimento do fungo. Após esse período, abriram-se os mesmos para secagem do fungo durante sete dias. Após o décimo primeiro dia de desenvolvimento, de cada um dos quatro sacos plásticos com fungo, de cada tratamento, retiraram-se 10g de arroz + fungo que foram colocadas para secar em estufa a 80-90°C durante três dias. A umidade da mistura arroz + fungo foi aferida comparando-se o peso final com o peso inicial da amostra. Do peso restante foram retiradas outras 10g para se determinar o nº de esporos produzidos por grama de arroz. A última parte foi peneirada, após sete dias de secagem, durante 20 minutos através de uma peneira metálica com 300 micrômetros acoplada a um recipiente coletor de esporos. Dos esporos puros coletados foram retiradas 0,3g para a determinação do nº de esporos puros por grama.

A mensuração para comparação do número de esporos produzidos nos diferentes tratamentos foi realizada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer.

A viabilidade dos esporos, após todo o processo de produção, foi conferida preparando-se uma suspensão de cada tratamento/repetição e inoculando-se em meio de cultura. Após 24 horas de incubação, fez-se a leitura da germinação com o auxílio de um microscópio ótico com magnificação de 400 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método desejado para uma produção em larga escala é aquele onde se obtém muitos esporos (ingrediente ativo do micoinseticida), com o menor custo e no menor tempo possível. Mas nem sempre se consegue combinar essas características desejáveis simultaneamente para todas as espécies de fungos entomopatogênicos.

Ao se correlacionar a umidade contida no arroz com fungo de cada espécie testada (Figura 1) no final do processo de desenvolvimento, com a produção de esporos por grama de arroz com fungo (Figura 2) e com a produção de esporos puros, observa-se que para o *M. anisopliae* a umidade final mais favorável foi ao redor de 35%, pois foi a que proporcionou maior número de esporos por grama de arroz ($1,2 \times 10^9$) e também um grande número de esporos puros por grama (6,01 x 10^{10}). O tratamento com 250g de arroz, com 35% de água deixados de molho por 30 minutos e autoclavados durante 20 minutos, foi o mais vantajoso, pois se autoclavou o arroz por menos tempo o que tornou o processo de produção mais barato e mais rápido. O mesmo pode-se concluir sobre o fungo *S. insectorum* ($1,2 \times 10^9$ esporos por grama de arroz) para as mesmas condições de

produção.

Quanto à espécie *B. bassiana* o máximo obtido foi de $5,3 \times 10^8$ esporos por grama de arroz no tratamento com 250g de arroz, com 80% de água, 30 minutos de molho e 20 minutos de autoclavagem. Isto demonstra que cada espécie de fungo possui suas exigências, em termos de quantidade inicial de água.

A viabilidade dos esporos após todo o processo de produção pode ser observada na Figura 4. Em todos os tratamentos não houve nenhum efeito adverso sobre a viabilidade dos mesmos após passarem pelo processo de secagem em baixa umidade e pelo peneiramento.

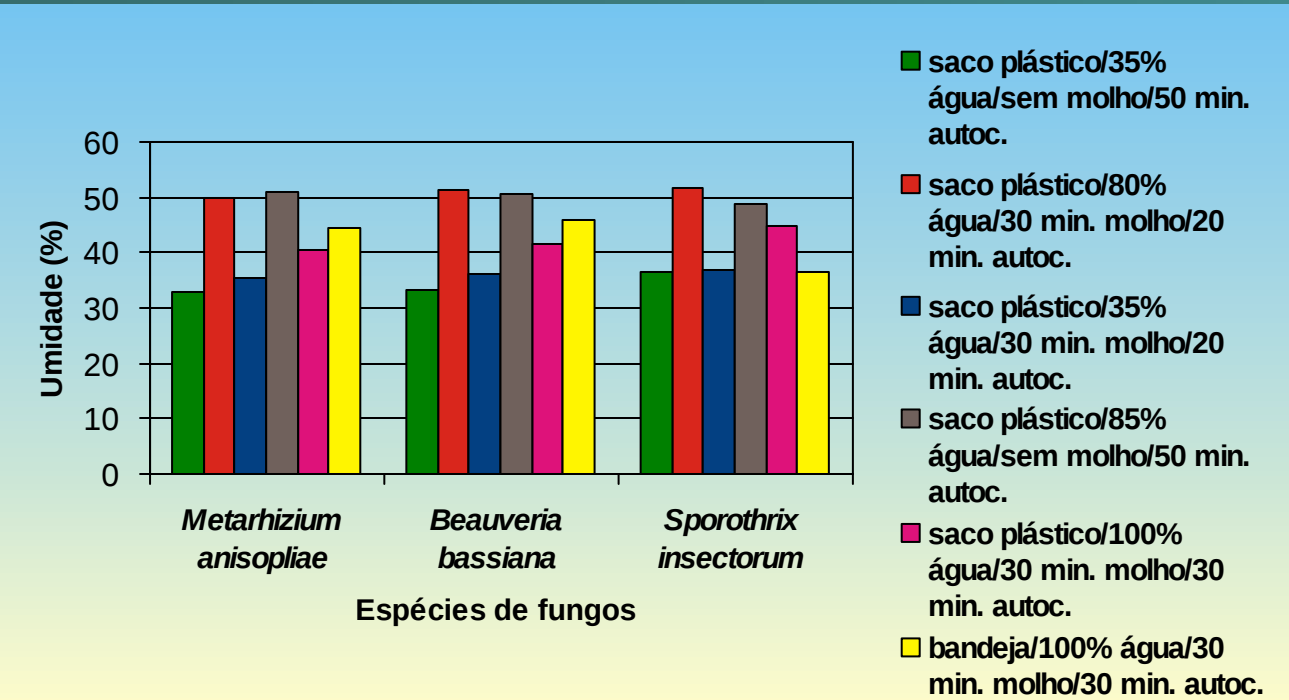


Figura 1. Porcentagem de umidade do arroz com fungo, após onze dias de desenvolvimento, de três diferentes espécies em seis métodos de produção.

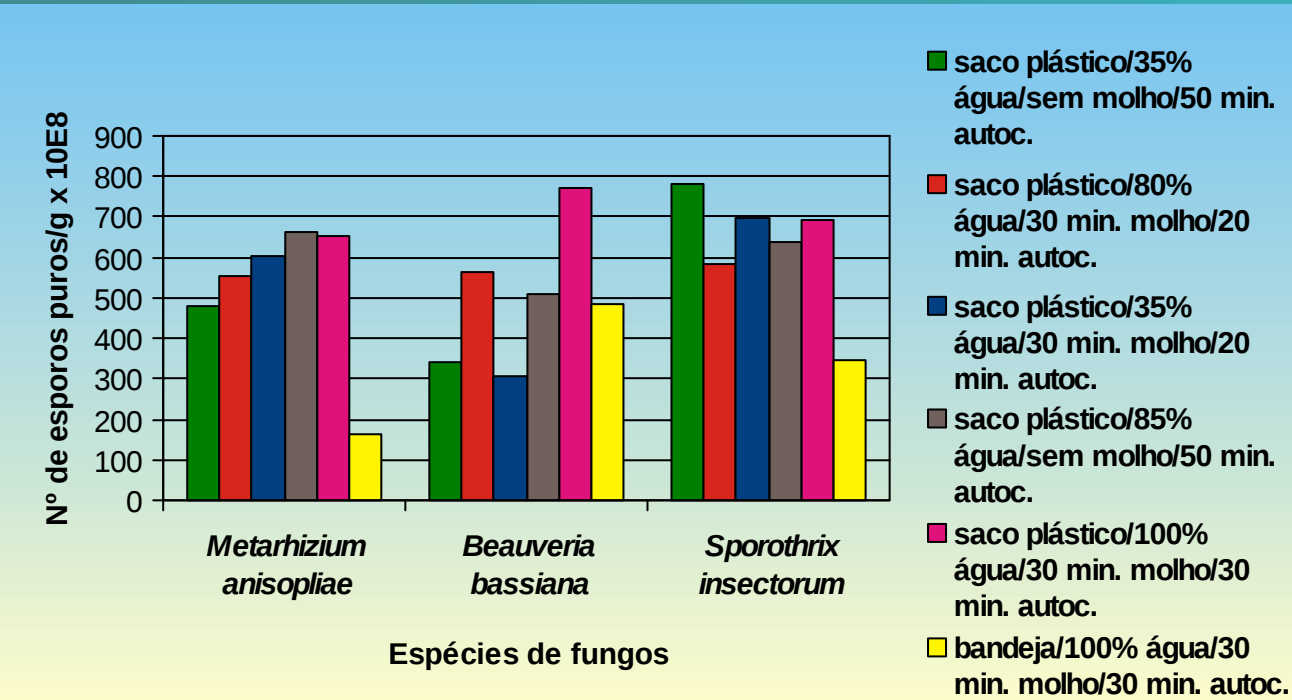


Figura 3. Número de esporos puros por grama.

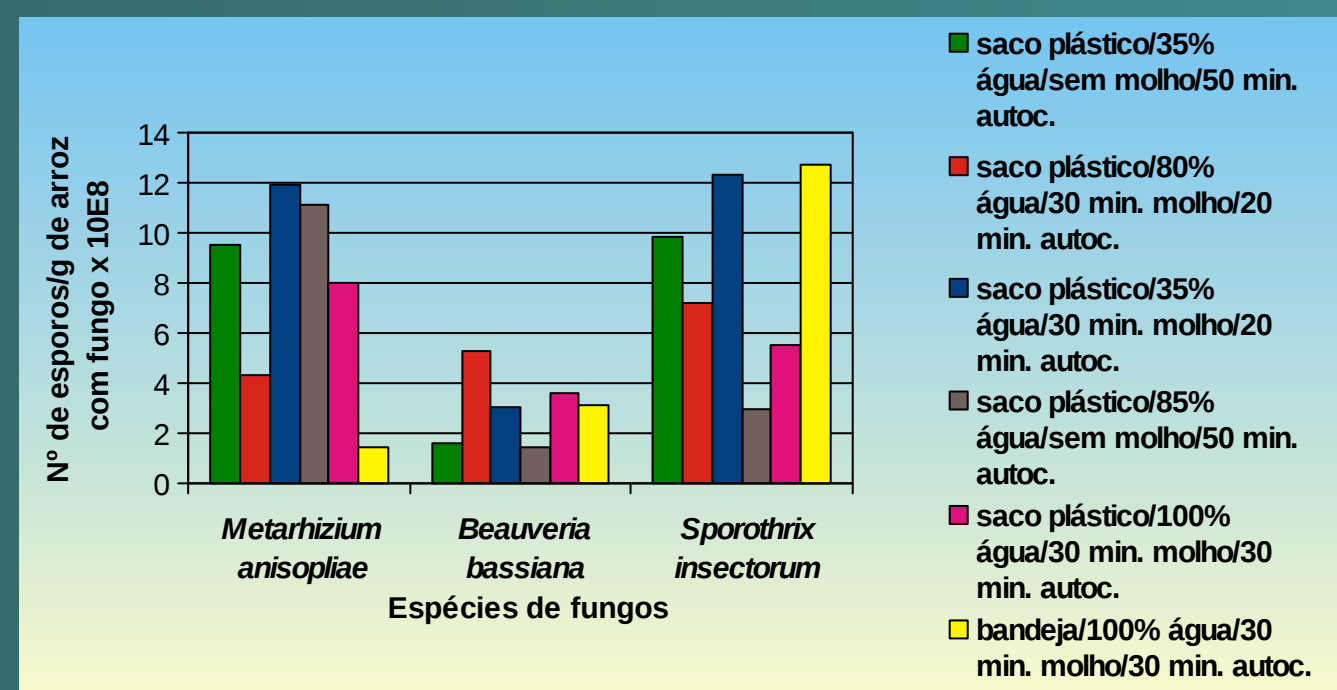


Figura 2. Número de esporos por grama de arroz com fungo nos diferentes tratamentos.

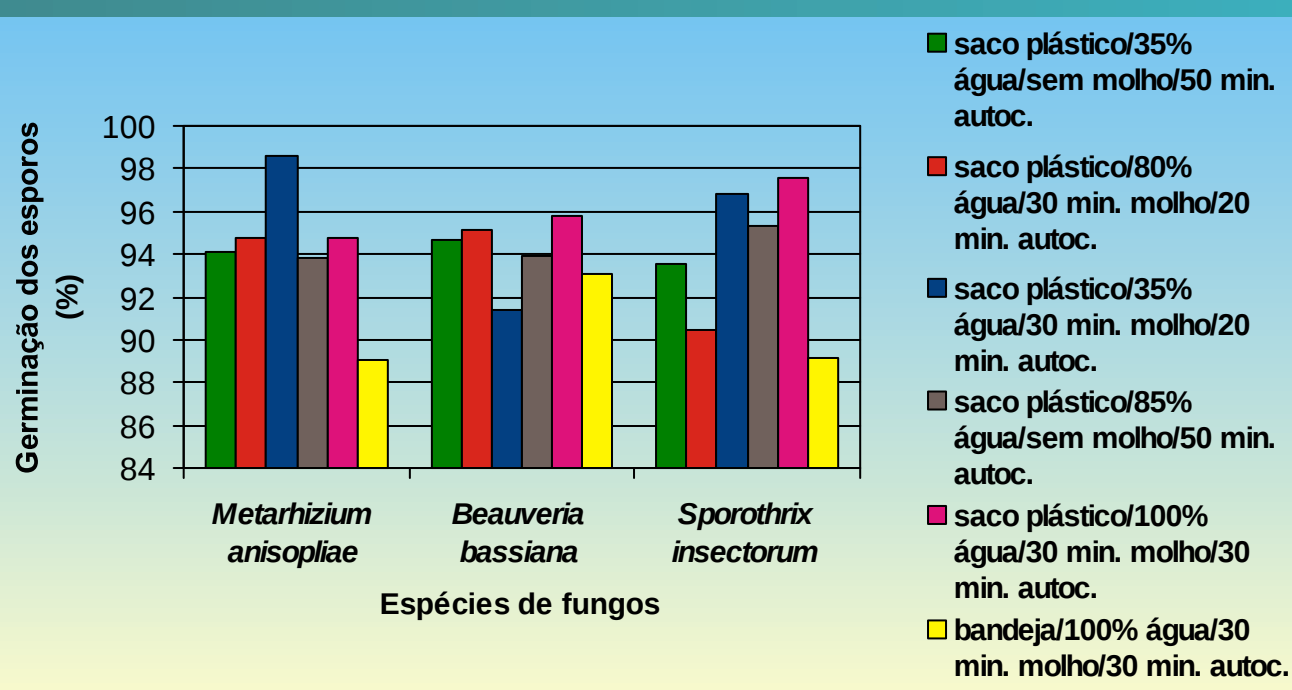


Figura 4. Porcentagem de germinação dos esporos de diferentes espécies de fungos, após a secagem do arroz.

CONCLUSÕES

- "O tratamento que proporcionou um maior nº de esporos por grama de arroz em sacos plásticos para o fungo *M. anisopliae* foi com 35% de água inicial, arroz ficando 30 minutos de molho e 20 minutos de autoclavagem. Para a produção de esporos puros separados do arroz por peneiramento o melhor foi com 85% de água inicial, sem o arroz ficar de molho e 50 minutos de autoclavagem.
- "Para *B. bassiana*, o maior nº de esporos por grama de arroz foi obtido com 80% de água inicial, 30 minutos de molho e 20 minutos de autoclavagem. Para a obtenção de esporos puros, o melhor foi com 100% de água inicial, 30 minutos de molho e 30 minutos de autoclavagem.
- "Para *S. insectorum* o maior nº de esporos por grama de arroz em bandejas foi obtido com 100% de água inicial, 30 minutos de molho e 30 minutos de autoclavagem. Para a obtenção de esporos puros, o melhor foi com 35% de água inicial, sem ficar de molho e 50 minutos de autoclavagem.
- "Em todos os tratamentos não houve nenhum efeito adverso sobre a viabilidade dos esporos.

- Alves, S.B. (1986). Fungos entomopatogênicos. In: Controle microbiano de insetos (Editado por Alves, S.B.), p. 73-126. Ed. Manole. São Paulo.

- Aquino, M.L.N., Cavalcanti, V.A.L.B., Sena, R.C. & Queiroz, G.F. (1975). Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. Boletim Técnico da CODECAP 4, 11-31.

- Aquino, M.L.N., Vital, A.F., Cavalcanti, V.A.L.B. & Nascimento, M.G. (1977). Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em sacos de polipropileno. Boletim Técnico da CODECAP 5, 7-11.

- Goettel, M.S. (1994). A simple method for mass culturing entomopathogenic Hyphomycete fungi. Journal of Microbiological Methods 3, 15-20.

- Jenkins, N.E., Hevief, G., Langewald, J., Cherry, A.J. & Lomer, C.J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information 19 (1), 21N-31N.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio prestado durante toda a realização deste trabalho pelos assistentes de operações da Embrapa Cerrados, Jânio Fonseca Silva e João Alves da Silva.