

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO – PR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PPGA**  
**MESTRADO**

**EFEITO DE ADITIVOS E FISHFERTILQUITOSANA<sup>®</sup>**  
**EM MEIOS SÓLIDOS NA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS**  
**DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN E**  
***Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRISCILA ANTUNES SCHAMNE**

**GUARAPUAVA-PR**

**2010**

Schamne, Priscila Antunes

S299e Efeito de aditivos e Fishfertilquitosana em meios sólidos na produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin / Priscila Antunes Schamne. -- Guarapuava, 2010  
viii, 48 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2010

Orientador: Edson Hirose

Co-orientadora: Cacilda Márcia Duarte Rios Faria

Banca examinadora: Mauricio Osvaldo Moura, Rosangela Dallemole Giaretta

#### Bibliografia

1. Agronomia. 2. Agroecologia. 3. Fungos entomopatogênicos 4. Controle microbiano. 6. Quitosana. 7. Pragas agrícolas. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

CDD 632

**PRISCILA ANTUNES SCHAMNE**

**EFEITO DE ADITIVOS E FISHFERTILQUITOSANA® EM MEIOS SÓLIDOS NA  
PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN E  
*Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edson Hirose  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cacilda Márcia  
Duarte Rios Faria

GUARAPUAVA-PR

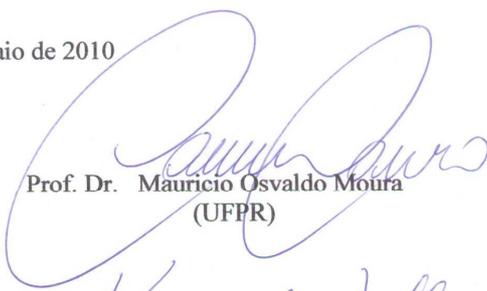
2010

**PRISCILA ANTUNES SCHAMNE**

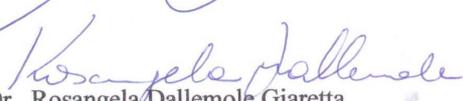
**EFEITO DE ADITIVOS E FISHFERTILQUITOSANA EM MEIOS SÓLIDOS NA  
PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.)  
SOROKIN E *BEAVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILLEMIN**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 31 de maio de 2010



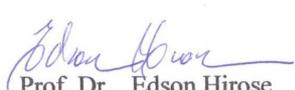
Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura  
(UFPR)



Prof. Dr. Rosângela Dallemole Giaretta  
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Cacilda Márcia Duarte Rios Faria  
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Edson Hirose  
(Orientador – UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR

2010

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha família, por todo o apoio, incentivo e compreensão.

Ao Luis Carlos, por todo o amor, carinho, por sempre estar ao meu lado, me ajudar em todos os momentos e nunca me deixar desistir, muito obrigada, essa conquista também é sua.

Ao orientador, Dr. Edson Hirose, pela confiança depositada e incentivo ao desenvolvimento deste trabalho.

À Cristhiane Rohde, pelo apoio, pelas valiosas discussões e sugestões, incentivo nas horas de desespero, pela ajuda, mais que preciosa, na condução dos experimentos. E acima de tudo pela amizade. Muito obrigada!

Aos professores Juliano Tadeu Vilela de Resende, Osmar Roberto Dalla Santa, pelo auxílio com os materiais na condução dos experimentos.

À Elaine Pittner, pelo apoio prestado, sempre fornecendo materiais e reagentes para os experimentos.

Aos colegas Marcos Barbosa e Fernando Ratuchne, pelo apoio, dedicando seus sábados nas avaliações dos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Fitopatologia (UNICENTRO), Carla Garcia, Carla Daiane Leite, Aline José Maia, que sempre me acolheram com afeto e amizade.

À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cacilda Márcia Duarte Rios Faria, pelo apoio e incentivo concedido durante o trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (UNICENTRO), que acreditaram e confiaram em mim. Obrigada pela oportunidade.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Fungos entomopatogênicos.....	4
2.1.1. Importância dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de pragas.....	4
2.1.2. Características gerais e aspectos biológicos de fungos entomopatogênicos.....	6
2.1.3. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuillemin.....	7
2.1.4. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin.....	7
2.2. Técnicas de produção massal de fungos entomopatogênicos.....	8
2.2.1. Produção de fungos entomopatogênicos em meio sólido.....	9
2.3. Aditivos utilizados para melhorar a produção de fungos entomopatogênicos.....	10
2.3.1. Adição de fontes de carbono e nitrogênio.....	11
2.3.2. Adição de sais minerais.....	12
2.4. Utilização da quitosana na agricultura.....	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
<b>CAPÍTULO I: EFEITO DE FISHFERTILQUITOSANA® SOBRE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK. E <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL.....</b>	<b>20</b>
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAIS E METÓDOS.....	23
2.1. Local do experimento.....	23
2.2. Obtenção e produção dos fungos entomopatogênicos.....	23
2.3. Crescimento vegetativo.....	23
2.4. Produção de conídios.....	24
2.5. Viabilidade dos conídios.....	24
2.6. Análise estatística.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1. Crescimento vegetativo.....	24
3.2. Produção de conídios.....	27
3.3. Viabilidade dos conídios.....	28
4. CONCLUSÕES.....	29

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
<b>CAPÍTULO II: EFEITO DE ADITIVOS EM SUBSTRATO DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK. E <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL. ....</b>	<b>33</b>
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1. Local do experimento.....	36
2.2. Obtenção dos isolados.....	36
2.3. Repicagem dos fungos entomopatogênicos.....	36
2.4. Efeito da adição de batata, lactose e extrato de levedura na produção de conídios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> .....	37
2.5. Efeito de sais minerais na produção de conídios dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em arroz.....	37
2.6. Produção de conídios.....	38
2.7. Viabilidade de conídios.....	38
2.8. Análise estatística.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.1. Efeito da adição de batata, lactose e extrato de levedura na produção de conídios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> .....	38
3.1.1. Produção de conídios.....	38
3.1.2. Viabilidade de conídios.....	42
3.2. Efeito de sais minerais na produção de conídios dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em arroz.....	44
3.2.1. Produção de conídios.....	44
3.2.2 Viabilidade de conídios.....	45
4. CONCLUSÕES.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## RESUMO

Priscila Antunes Schamne. Efeito de aditivos e Fishfertilquitosana<sup>®</sup> em meios sólidos na produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin.

Os fungos entomopatogênicos são empregados cada vez mais no controle de pragas agrícolas, por isso, tem-se a necessidade de desenvolver métodos mais eficientes de produção massal destes agentes. Assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito do produto Fishfertilquitosana<sup>®</sup> (FQT) sobre parâmetros biológicos dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, bem como o efeito de aditivos na produção de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em meio sólido de arroz. O produto Fishfertilquitosana<sup>®</sup> foi avaliado nas concentrações: 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4% sobre o crescimento vegetativo, conidiogênese e viabilidade dos conídios. Foi avaliada, ainda, a produção e a viabilidade de conídios em meio sólido de arroz utilizando os diferentes aditivos: caldo de batata (5%; 10%; 15%; 20%), lactose (1g; 2g; 3g; 4g;), extrato de levedura (0,005 g; 0,01 g; 0,1 g), além dos sais: NaNO<sub>3</sub>; KCl; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e ácido ascórbico na concentração 0,01 g. Em ambos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por regressão e teste de Tukey (P≤0,05). Verificou-se que o aumento do produto FQT no meio de cultura inibiu o crescimento vegetativo para ambos os fungos, a produção de conídios foi inversamente proporcional ao aumento de FQT no meio de cultura para *M. anisopliae*. Já para *B. bassiana* a concentração 0,1% causou a maior produção ( $5,32 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>), as demais concentrações reduziram a produção desse fungo. A adição do produto ao meio de cultura não afetou a viabilidade dos conídios, sendo que *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram germinação acima de 90 e 70%, respectivamente. O aumento da concentração de aditivos no meio de cultura de arroz causou uma pequena redução na produção de conídios de ambos os fungos avaliados, exceto no tratamento extrato de levedura 0,005 g e lactose 1 g onde houve um incremento na produção do fungo *M. anisopliae* ( $2,31 \times 10^8$  e  $1,89 \times 10^8$  conídios.g<sup>-1</sup>, respectivamente). A viabilidade não foi afetada pelos aditivos no meio de cultura em ambos os fungos avaliados. A adição de 0,01 g de KCl aumentou a produção de *M. anisopliae* e os demais tratamentos não afetaram a produção deste fungo. Já para *B. bassiana*, a adição de sais minerais ao meio de cultivo não afetou a sua produção. A germinação dos conídios de *M. anisopliae* não foi afetada pela adição de sais minerais ao meio de cultura. Para *B. bassiana* o tratamento NaNO<sub>3</sub> diferiu estatisticamente dos tratamentos MgSO<sub>4</sub> e KCl e os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento testemunha.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, controle microbiano, meios de cultura.

## ABSTRACT

Priscila Antunes Schamne. Effect of additives and Fishfertilquitosana<sup>®</sup> in solid media during conidia production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin.

Entomopathogenic fungi are increasingly used to control agricultural pests, so it is needed to develop more efficient methods to mass production of these agents. Thus, the objective of this study was evaluate the effect of Fishfertilquitosana<sup>®</sup> (FQT) on biological parameters of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, as well as the effect of additives in the production of *M. anisopliae* and *B. bassiana* at solid rice medium. The product Fishfertilquitosana<sup>®</sup> was evaluated at concentrations of 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4% considering vegetative growth, conidia production and viability. It was also evaluated, conidia production and viability at solid rice medium using different additives: potato broth (5%, 10%, 15%, 20%), lactose (1 g, 2 g, 3 g, 4 g); yeast extract (0.005 g, 0.01 g, 0.1 g), salts like NaNO<sub>3</sub>, KCl; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and ascorbic acid 0.01 g. In both experiments, data were subjected to analysis of variance and the means were compared by regression and Tukey test (P≤0.05). It was found that the increase of the product FQT at the culture medium inhibited the vegetative growth for both fungi, conidia production was inversely proportional to the increase of FQT at the culture medium for *M. anisopliae*. To *B. bassiana* at concentration of 0.1% it was observed the highest conidia production ( $5.32 \times 10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>), the other concentrations reduced the production of this fungus. The addition of the product to the culture medium did not affect the viability of conidia, and *M. anisopliae* and *B. bassiana* germinated above 90 and 70% respectively. Increasing the additives concentration at the culture rice medium, it was observed a small decrease at conidia production of both fungi studied, except at the treatment with yeast extract 1 g lactose 0.005 g which there was a production increasing of the fungus *M. anisopliae* ( $2.31 \times 10^8$  and  $1.89 \times 10^8$  conidia.g<sup>-1</sup>, respectively). Viability was not affected by additives at culture medium for both fungi species evaluated. The addition of 0.01 g of KCl increased the production of *M. anisopliae* and the other treatments did not affect the production of this fungus. For *B. bassiana*, the addition of mineral salts at the culture medium did not affect their production. Conidial germination of *M. anisopliae* was not affected by the addition of mineral salts at the culture medium. But for *B. bassiana*, the treatment with NaNO<sub>3</sub> differed statistically from the treatments with MgSO<sub>4</sub> and KCl, the other treatments showed no significant differences compared to the control treatment.

Keywords: entomopathogenic fungi, microbial control, culture media.

## 1. INTRODUÇÃO

O controle de pragas tem sido realizado quase que exclusivamente com o uso de agrotóxicos, gerando problemas de intoxicação humana e da fauna silvestre, resíduos nos alimentos, na água e no solo, aparecimento de novas pragas e de populações resistentes a esses produtos (Alves et al., 2008).

Assim, têm-se a necessidade de buscar métodos de controle alternativo de pragas, adotando-se práticas menos agressivas aos agroecossistemas e ao meio ambiente. Neste sentido, o controle biológico é uma importante ferramenta a ser utilizada no manejo integrado de diferentes insetos-praga na agricultura, uma vez que utiliza inimigos naturais para manter a população da praga abaixo dos níveis de dano econômico, evitando ao mesmo tempo prejuízos ambientais (Alves, 1998).

Exemplos bem sucedidos de controle biológico referem-se ao uso de microrganismos entomopatogênicos, neste caso destacam-se os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, que podem ser multiplicados facilmente (Alves, 1992). Segundo Strasser et al. (2000), os fungos entomopatogênicos apresentam vantagens ambientais e para a saúde, uma vez que não deixam resíduos nos alimentos, na água, no solo, polinizadores e nem os seres humanos.

Segundo Faria & Magalhães (2001), atualmente existem vários inseticidas biológicos à base de fungos em comercialização em diferentes países. No Brasil existem biofábricas para produção de fungos na região Nordeste para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*) e do besouro moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*). O Sudeste e o Centro-Oeste produzem fungos para o controle do percevejo de renda (*Leptopharsa heveae*) que ataca os seringais e de cigarrinhas-das-pastagens dos gêneros *Mahanarva*, *Deois* e *Zulia* (Alves, 1998).

Um dos principais fatores para o sucesso do controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos é a produção de grande quantidade de conídios por um preço competitivo. Assim, o processo de produção deve ser barato e ao mesmo tempo produzir conídios viáveis e virulentos (Robl et al. 2009). A produção tanto quantitativa como qualitativa de conídios depende do isolado, do substrato de produção e dos ingredientes incorporados que podem influenciar no desenvolvimento do fungo (Kassa et al., 2008).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de Fishfertilquitosana<sup>®</sup> e aditivos em meios sólidos visando aumentar a produção de conídios dos

fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* a fim de viabilizar a sua utilização em sistemas de cultivo orgânicos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Fungos entomopatogênicos

No Brasil, o controle microbiano de insetos teve grande desenvolvimento nos últimos anos e vem crescendo cada vez mais, o que pode ser demonstrado pelo aumento de artigos científicos nesta área. Além disso, grandes programas de controle microbiano têm marcado esse crescimento, como o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar com o fungo *M. anisopliae* (Leite et al., 2003a).

No controle microbiano de insetos, os fungos são os principais patógenos a serem utilizados, devido à capacidade de supressão de populações de insetos e ácaros praga, vasta gama de hospedeiros, possibilidade de produção *in vitro* e formulação desses agentes (Leite et al., 2003a).

Os fungos entomopatogênicos são patógenos de largo espectro capazes de causar epizootias naturais. Estes agentes podem infectar diferentes fases de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo que a maioria possui um mecanismo de penetração especializado via tegumento, característica vantajosa quando comparados com outros grupos de patógenos que infectam o inseto apenas via oral (Alves, 1998).

#### 2.1.1. Importância dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de pragas

Os resultados de pesquisas demonstraram eficácia ao utilizar fungos entomopatogênicos no controle biológico. Nesse sentido, a eficiência de *B. bassiana* foi observada para a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) onde ocorreu elevada virulência e grande potencial de produção de conídios sobre insetos mortos (Neves & Hirose, 2005).

Ainda, isolados de *B. bassiana* têm grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado para o controle do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Rohde et al., 2006; Santoro et al., 2008), pelo efeito nocivo em todas as fases de desenvolvimento desta praga, exceto o inseto adulto (Silva et al., 2006).

Isolados de *B. bassiana* também foram selecionados para o controle de *Orthezia praelonga* (Hemiptera: Ortheziidae), visando sua utilização como inseticida microbiano. Os

resultados indicaram que dos 50 isolados testados, 30 foram patogênicos para a cochonilha (Garcia & Alves, 2005).

Consolo et al. (2003), testando *M. anisopliae* e *B. bassiana* no controle de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) verificaram que *B. bassiana* causou 70% de mortalidade em larvas de terceiro instar sendo mais virulento que o fungo *M. anisopliae*.

A espécie *M. anisopliae* vem sendo cada vez mais estudada como agente de controle biológico para várias pragas. Pesquisas revelam que este agente é patogênico para o psilídeo da goiabeira *Triozoida limbata* (Hemiptera: Psyllidae), psilídeo *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), ácaro-rajado *Tetranychus uticae* (Acari: Tetranychidae) e o cascudinho *A. diaperinus* (Gassen, 2006; Padulla, 2007; Tamai, 2002; Rohde, et al., 2006).

*M. anisopliae* é eficiente no controle da cigarrinha-da-raíz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) na região de São Paulo, reduzindo as populações em até 91% (Miranda et al., 2004). Já no Nordeste, *M. anisopliae* é utilizado como forma de controle da *M. posticata* desde 1969 e vem trazendo resultados positivos (Alves et al., 2008).

Nos últimos anos, os produtores de cana-de-açúcar e usineiros do estado de São Paulo vêm investindo cada vez mais no controle biológico da cigarrinha-da-raiz utilizando *M. anisopliae*. Este entomopatógeno também é utilizado no controle das cigarrinhas-das-pastagens de forma inoculativa ou inundativa utilizando-se diversas formulações na dosagem mínima de  $1 \times 10^{12}$  conídios por hectare (Alves et al., 2008).

O fungo *M. anisopliae* também constitui-se uma alternativa promissora para ser utilizado como inseticida microbiano em condições de campo sobre *Scaptocoris carvalhoi* (Hemiptera: Cydnidae), onde Xavier & Ávila (2006) constataram que a mortalidade do percevejo chegou a 94% em experimentos de laboratório e em casa-de-vegetação.

A eficiência desses fungos também é relatada nas espécies *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae), *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), *Cornitermes* sp. (Isoptera: Termitidae), *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: Acrididae), *Leptopharsa heveae* (Heteroptera: Tingidae), *Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus* (Coleoptera: Curculionidae) (Lopes, 2005; Loureiro & Monteiro, 2005; Silva, 2001; Lohmann et al., 2009; Schmidt et al., 2007; Tanzini, 2002; Alves et al., 2008).

Dessa forma, torna-se evidente o amplo espectro de ação destes fungos, os quais podem ser utilizados em vários grupos de insetos no controle integrado de diversas pragas.

### 2.1.2. Características gerais e aspectos biológicos de fungos entomopatogênicos

Os fungos são organismos de tamanho e forma variáveis, podendo ser unicelulares ou constituídos por um conjunto de micélio com parede constituída de quitina ou celulose.

Aproximadamente 80% das doenças em insetos têm como agentes etiológicos os fungos, que englobam mais de 90 gêneros e 700 espécies. Destas a maioria já teve a presença registrada para o Brasil, sendo que mais de 20 espécies incidem sobre pragas de importância econômica (Alves, 1998). Dentre os gêneros mais importantes encontram-se *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (Shah & Pell, 2003).

Dentre as estruturas dos fungos utilizadas no controle de pragas e suas funções no ciclo natural do patógeno estão os conídios que têm como função a reprodução e disseminação; os blastosporos que se disseminam na hemolinfa do hospedeiro; o micélio com a função de migrar para fora do hospedeiro e permitir a conidiogênese do fungo; e os esporos de resistência, que permitem a sobrevivência do fungo no solo (Leite et al., 2003a).

Uma das vantagens da utilização destes fungos é o seu modo de penetração que ocorre principalmente via tegumento, podendo ocorrer também via espiráculos do hospedeiro (Pekrul & Grula, 1979).

O processo de infecção é iniciado pela germinação dos conídios sobre a cutícula do hospedeiro, que pode levar de 12 a 18 horas dependendo da disponibilidade de nutrientes (Alves, 1998). Isolados de *B. bassiana* germinam dentro de 18 horas e imediatamente iniciam o processo de penetração na cutícula do inseto (Pekrul & Grula, 1979). O conídio germina e o tubo germinativo se diferencia por dilatação da extremidade das hifas para a formação do apressório, que é estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro (Hajek & Leger, 1994).

Os insetos atacados por *B. bassiana* apresentam-se cobertos por um micélio branco caracterizando a doença muscardine branca, enquanto que os insetos infectados por *M. anisopliae* apresentam uma coloração que varia de verde claro a escuro, acinzentados ou ainda esbranquiçados com pontos verdes, caracterizando a muscardine verde (Alves, 1998).

Os fungos entomopatogênicos provocam o rompimento do tecido epitelial pela germinação/penetração ou pela liberação de toxinas que desestruturam a parede intestinal, possibilitando contaminação da hemolinfa, disseminando-se assim por todo o inseto (Loureiro et al., 2005). Decorridas 72 horas da inoculação o inseto apresenta-se totalmente colonizado e, sobre o cadáver ocorre a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios (Alves, 1998). Entretanto, quando a umidade do ambiente é baixa a conidiogênese pode ocorrer

internamente, como em gafanhotos do oeste africano infectados por *M. anisopliae* var. *acridum* (Shah & Pell, 2003).

A relação parasita-hospedeiro depende da espécie de inseto e das condições durante o desenvolvimento da doença. Alta umidade relativa e temperatura adequada são condições favoráveis para o crescimento do fungo e a ocorrência da doença, sendo que temperaturas altas e baixas retardam o crescimento do fungo e conseqüentemente o desenvolvimento da doença (Alves, 1998; Hallsworth & Magan, 1999).

### **2.1.3. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin**

O fungo *B. bassiana* pertence à classe Sordariomycetes, família Cordycipitaceae, e pode causar doença em coleópteros, lepidópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros e ortópteros, sendo uma das espécies mais estudadas no controle de artrópodes praga. Possui conídios globosos ou subglobosos que variam de 2 a 3µm de comprimento, com conidióforos formando densos ganchos (Alves, 1998).

Esta espécie é de ampla distribuição geográfica e ocorre frequentemente sobre os insetos e no solo, onde pode sobreviver por longo tempo (Alves, 1998). A temperatura favorável para seu desenvolvimento é de 22 a 26°C (Leite et al., 2003a), sendo mais exigente em nutrientes para o crescimento e germinação dos conídios (Sun & Liu, 2006).

### **2.1.4. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**

O primeiro trabalho de controle microbiano com um fungo entomopatogênico foi realizado por Ilya Metchnikoff com *M. anisopliae*, sobre larvas de um curculionídeo, importante praga da beterraba. A partir dessa época, as variedades e as diversas raças deste entomopatógeno vêm sendo estudadas. É possível que ele ocorra naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos (Alves, 1998).

Esta espécie da classe Sordariomycetes pertence à família Clavicipitaceae (Sung et al., 2007), é amplamente distribuída na natureza e caracteriza-se por atacar um grande número de insetos, pode ser encontrada no solo onde sobrevive por longos períodos.

Este fungo apresenta micélio hialino e septado, conídios cilíndricos que medem de 3 a 18 µm de comprimento que se formam sobre conidióforos cilíndricos (Alves, 1998). O crescimento e conidiogênese ótimos ocorrem em temperaturas entre 20 e 30°C (Vilacorta, 1978). Em altas temperaturas, como 40 e 45°C, não há germinação deste fungo (Vieira, 2007)

e em temperaturas abaixo de 16°C a germinação dos conídios é nula (Alves & Nogueira, 1984). Além da temperatura, outros fatores podem influenciar o desenvolvimento do fungo, como umidade, radiação e pH do meio de cultivo.

Em relação ao cultivo *in vitro*, o entomopatógeno é pouco exigente, podendo desenvolver-se em diversos meios de cultura, sendo o amido uma excelente fonte de carbono (Alves, 1998).

## **2.2. Técnicas de produção massal de fungos entomopatogênicos**

A produção de conídios de fungos entomopatogênicos pode ser alcançada utilizando-se de várias metodologias, desde técnicas simples até as mais sofisticadas, dependendo das condições disponíveis. A produção de um fungo pode ser feita utilizando o inseto hospedeiro, *in vivo*, ou através de processos fermentativos simples ou complexos, *in vitro*, ou ainda, através de utilização de meios de cultura sólidos de baixo custo (Posada-Flórez, 2008). A utilização de meios de cultura sólidos é uma das grandes vantagens da maioria dos fungos em relação a outros entomopatógenos obrigatórios, como vírus e protozoários, além da obtenção econômica de grandes quantidades de propágulos em tempos relativamente curtos (Alves, 1998).

A composição do meio tem uma estreita relação com uso e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, o formato e a quantidade de propágulo produzido (Oliveira, 2008). Além da composição do meio, as técnicas de produção de fungos entomopatogênicos devem ser de baixo custo e permitir a obtenção de alta concentração de formas viáveis e virulentas do patógeno que possam ser formuladas e utilizadas para o controle de pragas (Leite et al., 2003a).

Um meio de cultura deve possuir uma fonte de carbono e de nitrogênio, sais minerais e alguns fatores de crescimento (Soper & Ward, 1981; Alves, 1998). Assim, dependendo do tipo de propágulo desejado e da espécie a ser produzida, os fungos podem ser produzidos sobre meios artificiais utilizando-se três métodos: a) meios líquidos; b) meios sólidos; c) fermentação bifásica (Alves, 1998).

De modo geral, todos esses processos de fermentação têm sido utilizados em escala experimental e industrial para a obtenção de diversos tipos de propágulos fúngicos. No entanto, o processo mais usado para a produção industrial desses microrganismos tem sido o da fermentação sólida (Alves et al., 2008).

Os conídios podem ser produzidos em meios sólidos e líquidos, enquanto que as demais formas são geralmente produzidas somente em meios líquidos (Leite et al., 2003a).

### 2.2.1. Produção de fungos entomopatogênicos em meio sólido

A produção de fungos sobre meios sólidos, por não precisar de tecnologias aprimoradas como as exigidas na fermentação líquida, é a forma utilizada com maior frequência. Esse método permite a produção direta de unidades infectivas e devido à sua simplicidade de produção é usado em vários países para a produção artesanal e semi-industrial de fungos entomopatogênicos (Alves, 1998).

Considera-se que esta técnica seja a forma de produção mais adequada para os fungos que produzem conídios aéreos como *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em função das suas necessidades nutricionais e metabólicas, esses entomopatógenos se adaptam muito bem a esse processo. Além disso, os conídios podem ser separados facilmente do substrato e, geralmente, apresentam boa virulência para as pragas-alvo (Alves et al., 2008).

No método de produção em meios sólidos, o crescimento e a conidiogênese do fungo ocorrem sobre o substrato solidificado, sendo que uma produção em pequena escala pode ser feita sobre ágar ou outro agente solidificante (Moino Jr., 2000). No entanto, para uma produção em grande escala a utilização desses meios de cultura torna-se inviável devido ao elevado custo. Assim, para a produção de conídios em larga escala, têm sido utilizados produtos vegetais de baixo custo, especialmente grãos de arroz (Leite et al., 2003a). Esses substratos fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento e reprodução dos fungos (Alves, et al., 2008).

Nesta linha de pesquisa, Hadapad & Zebitz (2006) verificaram que o substrato de arroz é o meio mais adequado para o crescimento e conidiogênese de *B. brongniartii* atingindo uma produção máxima de conídios de  $1 \times 10^9$  conídios.g<sup>-1</sup> de substrato.

A produção do fungo sobre produtos vegetais pode ser feita em diferentes recipientes, conforme o objetivo e a escala de produção (Leite et al., 2003a). Basicamente existem três processos de produção utilizando meios sólidos: produção em sacos de polipropileno, em garrafas de vidro e em bandejas.

O uso de arroz cozido para a produção de *M. anisopliae* pelo método da bandeja permitiu um rendimento médio de 6 a 11,4 kg do fungo.100 kg<sup>-1</sup>, contendo  $10^{10}$  conídios.g<sup>-1</sup> do patógeno, enquanto que para *B. bassiana*, 3 kg do fungo do produto contendo  $2 \times 10^{11}$  conídios.g<sup>-1</sup> (Leite et al., 2003a). Já Loureiro et al. (2005) obtiveram uma menor produção de *M. anisopliae* utilizando o método de bandeja, cerca de  $2,3 \times 10^8$  conídios.g<sup>-1</sup>.

Garcia (2004) testou a eficiência de dois diferentes sistemas de produção, de bandeja e de caixa, de *Lecanicillium lecanii*, e observou que o método da bandeja proporcionou um rendimento superior ao método da caixa,  $1,9 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^9$  conídios.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos para aperfeiçoar e selecionar métodos mais eficientes de produção de fungos entomopatogênicos em meios sólidos para posterior utilização no controle biológico (Grim, 2001). Neste sentido, Name et al. (2003) verificaram que para *M. anisopliae*, a umidade final mais favorável foi ao redor de 35%, o que proporcionou maior número de conídios.g<sup>-1</sup> de arroz ( $1,2 \times 10^9$ ), já para *B. bassiana* o máximo obtido foi de  $5,3 \times 10^8$  conídios.g<sup>-1</sup> de arroz no tratamento com 80% de água.

As pesquisas em busca de substratos alternativos para melhorar a produção, infecção e armazenamento destes agentes têm sido cada vez mais desenvolvidas. Neste sentido, Kassa et al. (2008) demonstraram que o soro de leite pode ser utilizado como substrato alternativo para produção massal de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

### **2.3. Aditivos utilizados para melhorar a produção de fungos entomopatogênicos**

A composição de um meio de cultura deve ser constituída, basicamente, de ingredientes que forneçam carbono, nitrogênio, sais minerais e fatores de crescimento (Soper & Ward, 1981; Alves, 1998). As fontes de carbono comumente utilizadas são amido, glicose, sacarose, dextrose, entre outros açúcares. Já, as fontes de nitrogênio são geralmente derivadas de compostos ricos em proteína ou aminoácidos, como extrato de soja, extrato de levedura e peptona (Leite et al., 2003a).

A composição do meio de cultura pode influenciar o tipo, formato e quantidade de propágulo produzido, além de interferir na estabilidade após secagem e virulência do fungo. Por isso, no desenvolvimento de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos, a primeira etapa é selecionar um meio que proporcione uma boa produção da forma desejada do fungo. Após, é necessário avaliar o efeito de diferentes nutrientes sobre a produção e a infectividade do patógeno (Leite et al., 2003a).

Na produção de fungos, os meios deficientes em nitrogênio e ricos em carbono, tendem a produzir maior quantidade de conídios (Leite et al., 2003a). Dessa forma, os meios usados na produção massal de fungos são geralmente constituídos de produtos vegetais ricos em amido, como batata, arroz, aveia, milho e feijão. Destes, o arroz cozido é um dos meios mais utilizados para a produção de fungos (Jackson, 1997).

### 2.3.1. Adição de fontes de carbono e nitrogênio

Diversas fontes de carbono e nitrogênio têm sido estudadas no desenvolvimento de meios de cultura, principalmente de meios a base de produtos vegetais, visando um aumento na produtividade de fungos entomopatogênicos. Cintra et al. (1999), testaram diversas fontes de açúcar e nitrogênio em meio de cultura de arroz e verificaram que houve um aumento na produção de conídios de *M. anisopliae* com o açúcar lactose e a proteína extrato de levedura. Já para o fungo *B. bassiana*, estes autores observaram que apenas os tratamentos com sais minerais apresentaram aumento significativo na produção de conídios.

A adição de caseína em concentrações 0,01 a 1% e lactose de 1 a 3% na água do pré-cozimento do arroz aumentou a produção de conídios pelo método da bandeja em até quatro vezes para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Leite et al., 2003a).

Na produção líquida de *B. bassiana*, a produção de conídios pode ser aumentada por diversos tipos de açúcar, Thomas et al. (1987), verificaram que o uso de glicose aumentou a produção de conídios, enquanto Rombach (1989) observou que o rendimento máximo de conídios ocorreu em meios contendo sacarose e extrato de levedura ou em meios contendo maltose e extrato de levedura.

A produção dos fungos *Batkoa* sp., *Furia* sp. e *Neozygites floridana* foi maior quando adicionado 2,66% de glucose em relação ao meio com a mesma concentração de sacarose (Leite et al., 2003b). Estes mesmos autores verificaram que o extrato de levedura pode aumentar a produção de *Batkoa* sp., enquanto que para o fungo *Furia* sp. a combinação de extrato de levedura + extrato de carne + leite desnatado é responsável pelo incremento da produção, sugerindo que esta fonte de nitrogênio possui maior importância para *Furia* sp. do que para *Batkoa* sp.

A concentração de açúcar também pode influenciar a produção de fungos entomopatogênicos. Neste sentido, Pereira & Eira (1999) verificaram que a concentração de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose em meio de cultura de extrato de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) produziu o dobro de conídios de *M. anisopliae* por grama de substrato em relação à concentração 10 g.L<sup>-1</sup>.

Oliveira (2008) testou diferentes meios de cultura baseados em fontes protéicas provenientes de insetos e verificou que o meio de cultura contendo extrato de *Tenebrio* sp. aumentou a conidiogênese do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp. quantificada em 4,8×10<sup>6</sup> conídios.colônia<sup>-1</sup>.

### 2.3.2. Adição de sais minerais

Os sais minerais também são considerados no desenvolvimento de um meio para produção de fungos, sendo muitas vezes necessários para o cultivo de Entomophthorales, os quais são mais exigentes nutricionalmente (Leite et al., 2003a).

Poucos estudos referem-se ao uso de sais na produção de fungos entomopatogênicos, entretanto esses nutrientes orgânicos possuem grande importância no crescimento, desenvolvimento e mesmo a sobrevivência de fungos. O sódio e o potássio podem atuar não apenas como nutrientes, mas também como reguladores da pressão osmótica (Leite et al., 2003b).

Neste sentido Leite et al. (2003b) verificaram que a adição de sais ao meio de cultivo na produção de *Batkoa* sp., *Furia* sp. e *Neozygites floridana* em meio líquido, proporcionou um aumento significativo na produção destes fungos. Já, Cintra et al. (2000), verificaram que a adição de sais minerais ao meio de cultivo aumentou significativamente a produção de conídios do fungo *B. bassiana*. Barbosa et al. (2002) relatam que isolados de *L. lecanii* apresentaram bom desenvolvimento quando cultivados na presença de nitrato de sódio e sais com o íon amônio.

### 2.4. Utilização da quitosana na agricultura

A quitosana é um polímero policatiônico  $\beta$ -1,4 ligado à D-glucosamina e pode ser obtida a partir da quitina, por meio da desacetilação com álcalis. A quitina é um polissacarídeo natural extraído do exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo, lagosta e da parede celular de fungos como *Aspergillus niger* (Van Tieghem) e *Penicillium notatum* (Westling) (Tan et al., 1996).

A molécula de quitosana tem um duplo efeito na interação patógeno-hospedeiro, ou seja, atividade antifúngica e ativação das respostas de defesa da planta, como a produção de enzimas (Oh et al., 1998). Alguns pesquisadores explicam que a atividade antimicrobiana dessa substância ocorre por ação de grupos amínicos que, em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos de microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (Silva et al., 2006).

A quitosana tem sido aplicada na pós-colheita de frutos, devido à sua habilidade em formar películas semipermeáveis sobre produtos vegetais *in natura*, o que contribui para

umentar a vida de prateleira e a manutenção das características qualitativas. Esta camada na superfície do vegetal modifica a atmosfera interna e diminui o desenvolvimento de microrganismos (Botrel et al., 2007).

Embora existam diversos trabalhos na literatura envolvendo a quitosana e fungos fitopatogênicos, ainda são escassos os trabalhos desenvolvidos para avaliar a interação entre a quitosana e os fungos entomopatogênicos. Neste sentido, tornam-se válidos os trabalhos que busquem avaliar a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos com outros produtos utilizados na agricultura, como a quitosana.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, S/N, p.77-86, abr. 1992.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.

ALVES, S.B.; NOGUEIRA, N.L. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., 1984, Londrina. *Resumos...* Londrina, p. 170.

BARBOSA, C.C.; MONTEIRO, A.C.; CORREIA, A.C.B.; PEREIRA, G.T. crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.6, p.821-829, jun. 2002.

BOTREL, D.A; SOARES, N.F.F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R.M.; FONTES, E.A.F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, n.1, p.32-38, 2007.

CINTRA, E.R.R.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Efeito de aditivos no meio de cultura de arroz para a produção de *Metarhizium anisopliae*. *Resumos...* São Paulo: **Arquivos do Instituto Biológico**, 1999. v.66, p.100.

CINTRA, E.R.R.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Efeito de aditivos no meio de cultura de arroz para a produção de *Beauveria bassiana*. *Resumos...* São Paulo: **Arquivos do Instituto Biológico**, 2000. v.67, p.110.

CONSOLO, V.F.; SALERNO, G.L.; BERON, C.M. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. **BioControl**, Mar del Plata, v.48, n.6, p.705-712, dec. 2003.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil, **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.22, p.18-21, set/out. 2001.

GARCIA, M.O. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha:Ortheziidae)**. 2004. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga*. **Laranja**, Codeirópolis, v.26, n.1, p.1-10, 2005.

GASSEN, M.H. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos para o psilídeo da goiabeira *Triozioida* sp. (Hemíptera: Psyllidae) e compatibilidade de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre estes agentes de controle biológico**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, SP.

GRIM, C. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. **Crop Protection**, v.20, n.7, p.623-630, ago. 2001.

HADAPAD, A.B; ZEBITZ, C.P. Mass production, survival and evaluation of solid substrate inocula of *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch against *Holotrichia serrata* (Coleoptera:

Scarabaeidae). **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v.71, n.2, p. 433-441, 2006.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.74, n.3, p.261-266, nov. 1999.

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.293-322, 1994.

JACKSON, M.A. Optimizaing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, p.180-187, 1997.

KASSA, A.; BROWNBIDGE, M.; PARKER, B.L.; SKINNER, M.; GOULI, V.; GOULI, S.; GUO, M.; LEE, F.; HATA, T. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v.1, n.12, p.583-591, 2008.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Livroceres, 2003a. 92p.

LEITE, L.G.; ALVES, S.B.; BATISTA FILHO, A.; ROBERTS, D.W. Effect of salts, vitamins, sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of Entomophthorales: *Batkoa*, *Furia*, and *Neozygites*. **Mycological Research**, v.107, n.7, p. 872-878, jul. 2003b.

LOHMANN, T.R.; PAULINO, B.V.; LOPES, R.B.; MASCARIN, G.M. Controle de cupim-de-montículo (Isoptera: Termitidae) em pastagens com uso de produtos biológicos à base de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.1237-1240, nov. 2009.

LOPES, R.B. **Controle de *Blattella germanica* (L.) com *Metarhizium anisopliae* e inseticidas reguladores de crescimento**. 2005. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.4, p.553-561, jul./ago. 2005.

MIRANDA, L.L.D.; VASCONCELOS, A.C.M.; FERREIRA, J.M.G.; GARCIA JUNIOR, C.A.; COELHO, A.L.; GIL, M.A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em Cana-de-Açúcar. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, n.6, p.743-749, nov./dez. 2004.

MOINO JR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V.H.P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, 2000. p. 186-193.

NAME, K.P.O.; LEITE, A.F.G.; ALVES, R.T.; OLIVEIRA, M.A.S.; FIALHO, J.F.; FARIA, M.R.de.; FARIAS, A.R.N. Comparação de métodos de produção de esporos de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Sporothrix insectorum*. **Embrapa Cerrados**. Disponível em: <[http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2003/posteres/p2003\\_38.pdf](http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2003/posteres/p2003_38.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2008.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.1, p.77-82, jan./fev. 2005.

OH, S.K.; CHO, D.; YU, S.H. Development of integrated pest management techniques using biomass for organic farming (I). Suppression of late blight and fusarium wilt of tomato by chitosan involving both antifungal and plant activating activities. **Korean Society of Plant Pathology**, Suwon, v.14, p.278-285. 1998.

OLIVEIRA, I.M.de. **Aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp cultivado em diferentes meios de cultura**. 2008. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia) – Universidade Federal de Lavras – Lavras, MG.

PADULLA, L.F.L. **Estudos de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**. 2007. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

PEKRUL, S.; GRULA, E.A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, n.3, p.238-247, nov. 1979.

PEREIRA, S.R.M.; EIRA, A.F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sokorin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.389-394, 1999.

POSADA-FLÓREZ, F.J. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. 13 p. **Journal of Insect Science** 8:41, available online: [insectscience.org/8.41](http://insectscience.org/8.41). 2008.

ROBL, D.;SUNG, L. B.;NOVAKOVICH, J. H.;MARANGONI, P. R. D.;ZAWADNEAK, M. A. C.;DALZOTO, P. R.;GABARDO, J.;PIMENTEL, I. C. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) samson strains on agro-industrial residues **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40 p.296-300, 2009.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; SILVA, E.R.L.da.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, n.2, p.231-240, mar./abr. 2006.

ROMBACH, M. C. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina. Hyphomycetes) *Symphoduloconidia* in submerged culture. **Entomophaga**, v.34, n.1, p.45-52, mar. 1989.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J; ALEXANDRE, T.M.; SARTORI, D.; ALVES, L.F.A.; FUNGARO, M.H.P. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97, n.2, p.83-9, feb. 2008.

SCHMIDT, F.G.V.; SILVA, J.B.T; FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P.; ALVES, R.T.; LECOQ, M. **Metodologia de aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* para o controle do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* em campo.** 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2007. 11p. (EMBRAPA, Boletim Técnico, 208).

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, n.5, p.413-423, 2003.

SILVA, C.A.D.da. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.243-247, fev. 2001.

SILVA, A.S.; QUINTAL, A.P.N.; MONTEIRO, S.G.; DOYLE, R.L.; SANTURIO, J.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1944-1947, nov-dez. 2006.

SILVA, M.C.C.R.da. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranjas pós-colheita.** 2006. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. **Biological control in crop production.** New York, p.161-180, 1981.

STRASSER, H.; VEY, A.; BUTT, T. M. Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? **Biocontrol Science and Technology**, v.10, n.6, p.717-735, 2000.

SUN, M.H.; LIU, X.Z. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. **Mycopathologia**, v.161, n. 5, p.295-305, may. 2006.

SUNG, H.J.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, Baarn, v.57, n.1, p.5-59, may. 2007.

TAMAI, M.A. **Controle de *Tetranychus uticae* Koch com fungos entomopatogênicos**. 2002. 144p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M.; KHOR, E. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, London, v.30, n.4, p.239–242, 1996.

TANZINI, M.R. **Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos**. 2002. 140p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

THOMAS, K.C.; KHACHATOURIANS, G.G.; INGLEDEW, W.M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, n.1, p.12-20, 1987.

VIEIRA, P.D.S.; SILVA, W.M.T.; PAIVA, L.M.; LUNA-ALVES LIMA, E.A.; CAVALCANTI, V.L.B. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação dos conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em diferentes temperaturas. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.1, p.17-21, jan./jun. 2007.

VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4, Bahia. **Resumos**. 1978. p.70.

XAVIER, L.M.S.; ÁVILA, C.J. Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin a *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera, Cydnidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.50, n.4, p.540-546, dez. 2006.

## CAPÍTULO I

### EFEITO DE FISHFERTILQUITOSANA<sup>®</sup> SOBRE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)

### SOROK. E *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL.

#### RESUMO

O controle de pragas tem sido realizado basicamente por meio de produtos fitossanitários sintéticos, gerando problemas ao meio ambiente, homem e também aos inimigos naturais de pragas agrícolas. Dentre os inimigos naturais diretamente prejudicados estão os fungos entomopatogênicos. Neste sentido, a busca por produtos mais seletivos é necessária para que não se eliminem ou diminuam a ação dos inimigos naturais, principalmente os fungos entomopatogênicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a compatibilidade e o efeito do produto Fishfertilquitosana<sup>®</sup> (FQT) sobre o crescimento vegetativo, produção e viabilidade dos conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. O produto foi incorporado ao meio de cultura BDA e distribuído em placas de Petri nas concentrações: 0%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%. Cada tratamento teve cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão ( $P \leq 0,05$ ). Verificou-se que o aumento do produto Fishfertilquitosana<sup>®</sup> no meio de cultura inibiu o crescimento vegetativo para ambos os fungos avaliados. A produção de conídios foi inversamente proporcional ao aumento de FQT no meio de cultura para *M. anisopliae*. Já para *B. bassiana* a concentração 0,1% aumentou a produção de conídios ( $5,32 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>), as demais concentrações reduziram a produção desse fungo. A adição do produto ao meio de cultura não afetou a viabilidade dos conídios, sendo que *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram germinação acima de 90 e 70%, respectivamente.

Palavras-chave: quitosana; compatibilidade; fungos entomopatogênicos.

## ABSTRACT

Priscila Antunes Schamne. Fishfertilquitosana<sup>®</sup> effect of on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Pest control has been accomplished primarily through synthetic phytosanitary products, causing problems to the environment, people and also to the natural enemies of agricultural pests. Among the natural directly harmed enemies, there are entomopathogenic fungi. In this way, the search for more selective products is necessary to avoid the elimination or reduction of the natural enemies, mainly the entomopathogenic fungi. This study aimed to evaluate the compatibility and the effect of the product Fishfertilquitosana<sup>®</sup> (FQT) considering vegetative growth, production and conidia viability of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. The product was incorporated at PDA culture medium and distributed in Petri plates at concentrations of: 0%, 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%. Each treatment had five repetitions. Data were subjected to analysis of variance and regression ( $P \leq 0.05$ ). It was found that the increase of Fishfertilquitosana<sup>®</sup> product at the culture medium inhibited the vegetative growth for both fungi species evaluated. Conidia production was inversely proportional to the increase of FQT at the culture medium for *M. anisopliae*. To *B. bassiana* at concentration of 0.1% conidia production was increased ( $5.32 \times 10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>), the other concentrations reduced the production of this fungus. The addition of the product to the culture medium did not affect the viability of conidia, and *M. anisopliae* and *B. bassiana* germinated above 90 and 70% respectively.

Keywords: chitosan; compatibility; entomopathogenic fungi.

## 1. INTRODUÇÃO

O controle de pragas e doenças tem sido realizado basicamente por meio de produtos fitossanitários sintéticos, gerando problemas ao meio ambiente, ao homem e também aos inimigos naturais de pragas agrícolas. Dentre os inimigos naturais diretamente prejudicados estão os fungos entomopatogênicos, pois, estes produtos podem causar inibição no crescimento vegetativo, na produção e viabilidade dos conídios e na sua virulência (Cavalcanti et al., 2002). Assim, a busca por produtos mais seletivos é necessária para que não se eliminem ou diminuam a ação dos inimigos naturais.

A quitosana, obtida a partir da quitina, apresenta diversas aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos, também pode ser utilizada como revestimento dos frutos, atrasar o amadurecimento e senescência dos frutos, além de promover respostas de defesa em várias plantas (Silva, 2006). Além disso, também é utilizada no controle de certos tipos de fungos fitopatogênicos, como o *Penicillium* sp em maçãs (Botelho et al., 2009). Dessa forma, a quitosana vem despertando o interesse de muitos pesquisadores, devido a baixa toxicidade, ser biodegradável, não alérgica, anticoagulante, antifúngica e antimicrobiana (Silva et al., 2006).

Na linha dos bioinseticidas e da agroecologia, os fungos entomopatogênicos são os principais patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. Devido, basicamente à capacidade de supressão de populações de insetos e ácaros praga, vasta gama de hospedeiros, possibilidade de produção *in vitro* e formulação desses agentes (Leite et al., 2003a).

No manejo integrado de pragas, os microrganismos e outros agentes de controle biológico podem atingir seu maior potencial se protegidos ou associados a produtos compatíveis, como agrotóxicos, fertilizantes etc. Estudos relacionados a casos de interação do controle microbiano com outros métodos de controle de pragas e de doenças ainda são pouco conhecidos. Por outro lado, a preocupação da comunidade científica em avaliar e divulgar a importância do controle associado vem crescendo (Alves et al., 2008).

A integração de entre bioprodutos e agrotóxicos ou outros inimigos naturais tem sido utilizada em países da América Latina. O uso de agrotóxicos compatíveis a entomopatógenos é uma estratégia prática que visa preservar os microrganismos e outros agentes de controle biológico, dando oportunidade para que eles possam mostrar todo o seu potencial de controle (Alves et al., 2008).

Neste sentido, considerando a possibilidade de utilização da quitosana na agricultura e da importância dos fungos entomopatogênicos no controle microbiano, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a compatibilidade de Fishfertilquitosana<sup>®</sup> (2% quitosana) e seu efeito sobre o crescimento vegetativo, produção e viabilidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Entomologia e de Fitopatologia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO (Guarapuava, PR).

### 2.2. Obtenção e produção dos fungos entomopatogênicos

Os isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (MA/037) e *Beauveria bassiana* (UNI/65), provenientes da Universidade Estadual de Londrina – UEL e Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, respectivamente, foram armazenados na forma de conídios a -4°C. Para a realização dos experimentos os fungos foram multiplicados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), segundo metodologia adaptada de Alves (1998) e mantidos em câmara climatizada a 25±1°C; fotoperíodo de 12 horas e UR 70±10%.

### 2.3. Crescimento vegetativo

As concentrações de FQT: 0%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,2% ou 0,4% (mL FQT.mL<sup>-1</sup> de meio) foram adicionadas em 160 mL de meio de cultura BDA e autoclavado a 1 Atm a 120°C durante 15 minutos. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri (9 cm) esterilizadas.

Os fungos foram repicados em três pontos equidistantes de cada placa com o auxílio de uma alça metálica. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo que a unidade amostral foi a placa de Petri. Os fungos foram incubados em câmara climatizada à temperatura de 25±1°C; fotoperíodo de 12h e UR 70±10% por dez dias. Após esse período cada colônia foi medida com o auxílio de um paquímetro, em dois sentidos perpendiculares.

## 2.4. Produção de conídios

Após a avaliação do crescimento vegetativo, com o auxílio de um vazador, um disco de 18 mm foi retirado de uma colônia de cada placa, os discos foram colocados em tubos de ensaio e os conídios suspensos em 10 mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo (Tween 80<sup>®</sup>-0,01%) e contados com o auxílio de câmara de Neubauer, segundo metodologia adaptada de Alves (1998).

## 2.5. Viabilidade dos conídios

Para a determinação da viabilidade dos conídios, de cada disco de colônia, foi transferido 0,1 mL de suspensão fúngica padronizada na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; fotoperíodo de 12 horas e UR  $70 \pm 10\%$ . Após 24 horas a porcentagem de conídios germinados e não germinados foi determinada sob microscópio óptico segundo metodologia adaptada de Alves (1998).

## 2.6. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Os dados de diâmetro de colônia e a contagem de conídios não foram transformados, os dados de porcentagem de germinação foram transformados para arcoseno ( $\sqrt{x/100}$ ). Após adequação dos dados, estes foram submetidos à análise de variância e análise de regressão ( $P \leq 0,05$ ) utilizando o programa Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira, 2000).

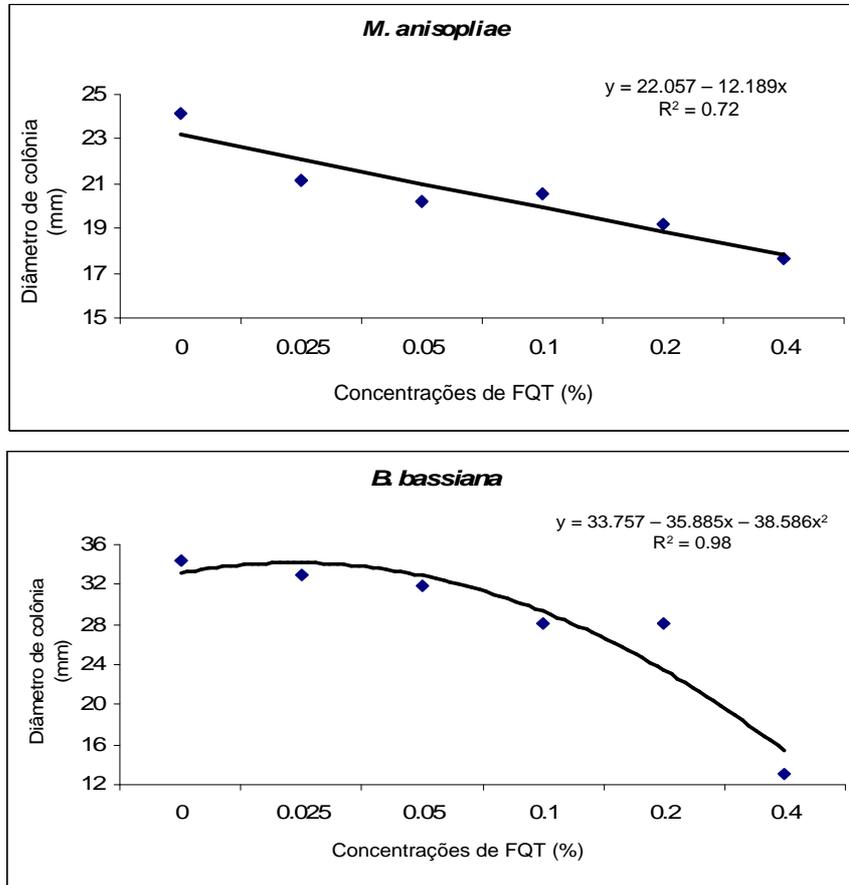
# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. Crescimento vegetativo

Os maiores valores para ambos os fungos foram obtidos no tratamento testemunha, sendo que o diâmetro médio de colônia para *M. anisopliae* foi de 24,2 mm e para *B. bassiana* foi de 34,3 mm (Figura 1).

Verificou-se que o aumento da concentração de Fishfertilquitosana<sup>®</sup> no meio de cultura inibiu o crescimento de ambos os fungos avaliados, sendo que *M. anisopliae* e *B.*

*bassiana* apresentaram diâmetro de colônia de 17,7 mm e 13,0 mm na maior concentração (0,4%), respectivamente e, na menor concentração (0,025%) apresentaram diâmetro igual a 21,1 mm e 32,9 mm, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Diâmetro de colônia de *M. anisopliae* (MA/037) e *B. bassiana* (UNI/65) em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de FQT, dez dias após a repicagem ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 12h fotoperíodo e  $70\pm 10\%$  UR).

As menores concentrações de quitosana causaram um efeito mais acentuado sobre as colônias de *M. anisopliae*. Na concentração de 0,025, a redução no crescimento vegetativo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi de 12,8% e 4,1%, respectivamente, em relação ao tratamento testemunha. Já na concentração de 0,05%, a porcentagem de redução no diâmetro das colônias aumentou para 16,5% no fungo *M. anisopliae* e 6,9% para *B. bassiana*.

Por outro lado, as maiores concentrações de quitosana tiveram um efeito maior sobre o fungo *B. bassiana*. Na maior concentração de FQT (0,4%) o diâmetro da colônia de *B. bassiana* reduziu em 62,1%, em relação ao tratamento testemunha (Figura 2), já para o fungo *M. anisopliae* a redução do crescimento vegetativo não foi tão acentuada, sendo de 26,9%.



**Figura 2.** Crescimento vegetativo de *B. bassiana* (UNI/65) em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de FQT, dez dias após a repicagem (tratamento testemunha à esquerda e tratamento 0,4% à direita).

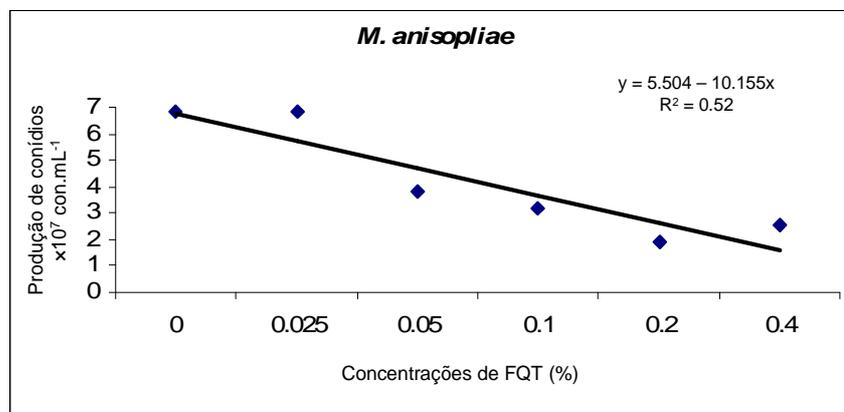
O efeito inibitório da quitosana já foi observado em outros fungos (Silva, 2006; Camili et al., 2007). Essa atividade antimicrobiana poderia ser explicada por seus grupos amínicos que, em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (Silva et al., 2006). Este mesmo efeito foi observado para ambos os fungos entomopatogênicos testados. Assim a utilização conjunta de produtos a base de quitosana, com fungos entomopatogênicos, pode não ser recomendável a campo.

Apesar de a quitosana ser um produto obtido da quitina de crustáceos, a composição química é distinta, e não proporcionou melhora no desenvolvimento dos fungos testados, mesmo a utilização de quitina de insetos no meio de cultura não necessariamente proporcionaria um melhor desenvolvimento de fungos entomopatogênicos. Neste sentido, Rodríguez-Gómez et al. (2009) observaram que para um isolado mutante de *B. bassiana*, o meio SDA (Sabouraud-dextrose-ágar) proporcionou a maior taxa de crescimento micelial e produção de conídios, quando comparado aos meios contendo quitina coloidal e exoesqueleto de gafanhoto.

Por outro lado Pereira & Eira (1999) observaram que *M. anisopliae* produziu o dobro de conídios quando em meio de cultura contendo extrato de *N. viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) e Santoro et al. (2005) constataram que o meio contendo farinha de crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)) foi o adequado para a produção de conídios de *B. bassiana* ( $2,8 \times 10^{12}$  conídios.g<sup>-1</sup>).

### 3.2. Produção de conídios

Verificou-se que FQT teve efeitos diferenciados em cada um dos fungos estudados. Para o fungo *M. anisopliae*, a produção de conídios foi inversamente proporcional ao aumento de FQT no meio de cultura, apresentando a maior produção no tratamento testemunha ( $6,8 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>). Dessa forma, a menor produção foi obtida na maior concentração do produto ( $2,6 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>), a qual teve uma redução de 62,1% em relação à testemunha. Na concentração de 0,025%, a produção de conídios de *M. anisopliae* foi semelhante à testemunha, sendo igual a  $6,8 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup> (Figura 3).

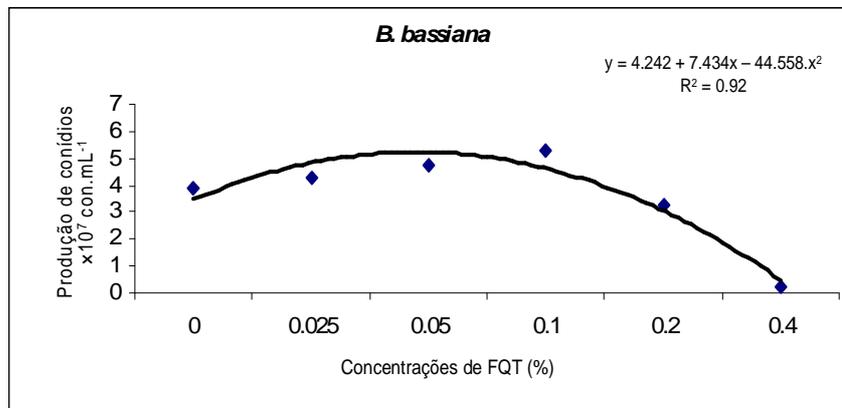


**Figura 3.** Produção de conídios de *M. anisopliae* (MA/037) em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de FQT (25±1°C, 12h fotoperíodo e 70±10% UR).

Para o fungo *B. bassiana* houve um aumento na produção de conídios com o aumento da concentração de FQT no meio de cultura até a concentração de 0,1%, porém, nas concentrações maiores houve uma redução da produção de conídios (Figura 4). A concentração de 0,1% teve destaque em relação às demais concentrações, tendo uma produção de  $5,3 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup> para esse fungo. Já a concentração de 0,4% causou uma redução de 94,8% na produção de conídios, quase inibindo totalmente a conidiogênese desse patógeno (Figura 4).

A resposta diferenciada de *B. bassiana* e *M. anisopliae* às concentrações de FQT pode ser explicada pela hipótese sugerida por Moino Jr. & Alves (1998), em que alguns fungos entomopatogênicos podem aumentar a sua reprodução quando em presença de um princípio tóxico que altere seu ambiente, prejudicando seu desenvolvimento, resultando assim, em maiores níveis de conidiogênese. Os fungos por serem de espécies diferentes são esperados

que tenham faixas de concentrações inibitórias diferenciadas, mas estes resultados sugerem que *M. anisopliae* é menos sensível ao FQT.



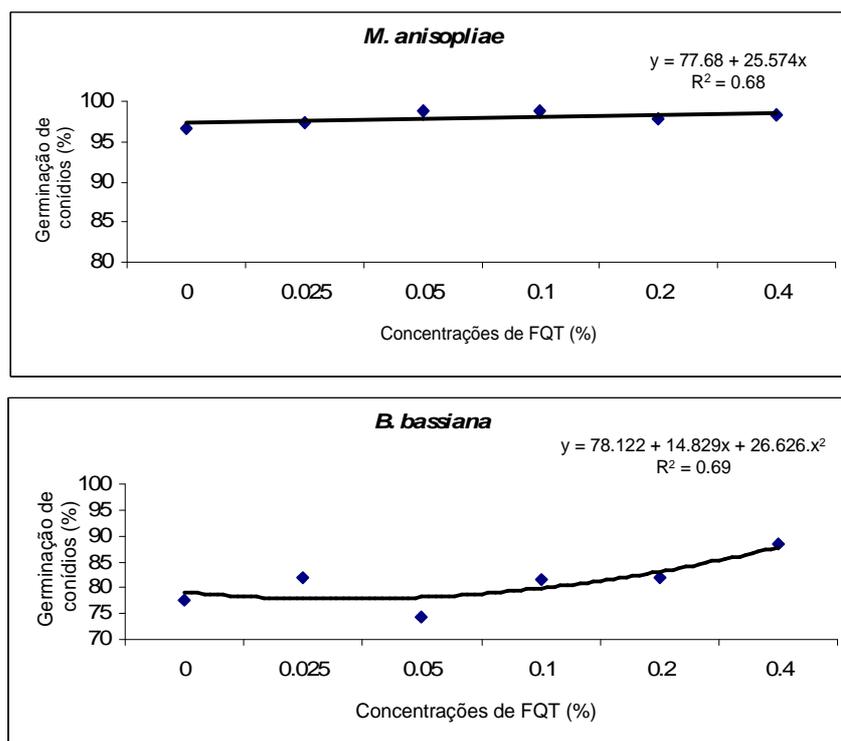
**Figura 4.** Produção de conídios de *B. bassiana* (UNI/65) em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de FQT (25±1°C, 12h fotoperíodo e 70±10% UR).

### 3.3. Viabilidade de conídios

De maneira geral, a adição de FQT no meio de cultura teve pouco efeito sobre ambos os fungos avaliados, sendo que *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram na maior concentração (0,4%) percentual de germinação de 98,2% e 88,3%, respectivamente. Na menor concentração (0,025%), apresentaram germinação igual a 97,3% e 77,6%, respectivamente (Figura 5).

Para *M. anisopliae*, a adição de 0,05%, 0,1% ou 0,4% proporcionou germinação igual a 98%, maior que o percentual de germinação do tratamento testemunha, que foi de 96,7%. As concentrações 0,025% e 0,2% de FQT também apresentaram percentual maior do que o tratamento testemunha, porém, menores em relação aos demais tratamentos (Figura 5).

Para *B. bassiana*, com o aumento da concentração de FQT observou-se um aumento na germinação dos conídios, exceto na concentração 0,05%, que obteve o menor percentual de germinação (74,5%) (Figura 5).



**Figura 5.** Percentual de germinação de conídios de *M. anisopliae* (MA/037) e *B. bassiana* (UNI/65) em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de FQT ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 12h fotoperíodo e  $70\pm 10\%$  UR).

O meio de cultura utilizado nos testes de germinação foi ágar-água (AA), um meio ausente de nutrientes. Alves (1998) ressalta que a germinação de conídios de fungos entomopatogênicos pode ser influenciada pela presença de nutrientes no meio de cultura, tais como aminoácidos, esterol, hexoses, entre outros. Tendo em vista que o fungo *B. bassiana* é mais exigente que o fungo *M. anisopliae*, essa pode ser a provável explicação para o baixo percentual de germinação do primeiro fungo. Francisco et al. (2006) comprovaram que meios ricos em nutrientes como BDA, BDA+1% de extrato de levedura e meio completo (Pontecorvo et al., 1953, modificado por Azevedo & Costa, 1973) favorecem a germinação e meios pobres como ágar-água e meio mínimo (Pontecorvo et al., 1953) promovem baixa germinação de isolados deste entomopatógeno.

#### 4. CONCLUSÕES

- A adição de FQT ao meio de cultura inibiu o crescimento vegetativo de ambos os fungos avaliados.

- A produção de conídios foi inversamente proporcional ao aumento de FQT no meio de cultura para *M. anisopliae*.
- Para *B. bassiana* a concentração 0,1% causou a maior produção de conídios e as demais concentrações reduziram a produção desse fungo.
- A adição do produto ao meio de cultivo não afetou a viabilidade dos conídios de ambos os fungos avaliados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Nacional e Edusp, 1973. 288p.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; RICKLI, E.H.; LEITE, C.D.; FARIA, C.M.D.R. Tratamento pós-colheita de maçãs com quitosana para controle de *Penicillium* sp. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.4, n.2, p.117-120, nov. 2009.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.33, n.3, p.215-221, 2007.

CAVALCANTI, R.S.; MOINO JR., A.; SOUZA, G.C.; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitosanitários fenprotrina, imidaclopride, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.69, n.3, p.17-22, jul./set., 2002.

FERREIRA, D.F. 2000. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>>. acesso em: 02 ago 2008.

FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D.A.; CORREIA, A.C.B.; MONTEIRO, A.C. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1309-1312, jul/ago. 2006.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Livroceres, 2003. 92p.

MOINO JR, A.; ALVES, S.B. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.27, n.4, p.611-619, dez. 1998.

PEREIRA, S.R.M.; EIRA, A.F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sokorin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.389-394, 1999.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v.5, p.141-238, 1953.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, D.; LOERA, O.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; VINIEGRA-GONZALÉZ, G. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v.25, n.3, p.513-518, mar. 2009.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J; SILVA, R.Z.da.; AKIMI, S.; ZORZETTI, J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana*(Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.3, p.313-320, jul/set. 2005.

SILVA, H.S.R.C; SANTOS, K.S.C.R.dos.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SILVA, M.C.C.R.da. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranjas pós-colheita.** 2006. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

## CAPÍTULO II

### EFEITO DE ADITIVOS EM SUBSTRATO DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL.

#### RESUMO

O incremento de meios de cultura com diversas fontes de carbono e nitrogênio, principalmente de meios a base de produtos vegetais, tem sido estudado com o objetivo de aumentar a produtividade de fungos entomopatogênicos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de aditivos na produção dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em substrato de arroz. A produção e a viabilidade de conídios em meio sólido de arroz foi avaliada utilizando os diferentes aditivos: caldo de batata (5%; 10%; 15% e 20%), lactose (1 g; 2 g; 3 g e 4 g;), extrato de levedura (0,005 g; 0,01 g e 0,1 g), além dos sais: NaNO<sub>3</sub>; KCl; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e ácido ascórbico na concentração 0,01 g. Cada tratamento teve quatro repetições, sendo o tratamento testemunha constituído apenas por substrato de arroz. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por regressão e teste de Tukey (P≤0,05). Verificou-se que o aumento da concentração de aditivos no meio de cultura de arroz causou uma pequena redução na produção de conídios de ambos os fungos avaliados, exceto no tratamento extrato de levedura 0,005 g e lactose 1 g onde houve um incremento na produção de *M. anisopliae* ( $2,31 \times 10^8$  e  $1,89 \times 10^8$  conídios.g<sup>-1</sup>, respectivamente). A viabilidade dos conídios não foi afetada pelos aditivos no meio de cultura. A adição de 0,01 g de KCl aumentou a produção de *M. anisopliae* e os demais tratamentos não afetaram a produção deste fungo. A adição de sais minerais ao meio de cultivo não afetou a produção de *B. bassiana*. A germinação dos conídios de *M. anisopliae* não foi afetada pela adição de sais minerais ao meio de cultura. Já para *B. bassiana* o tratamento NaNO<sub>3</sub> diferiu estatisticamente dos tratamentos MgSO<sub>4</sub> e KCl, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento testemunha.

Palavras-chave: controle microbiano; produção massal; fungos entomopatogênicos.

## ABSTRACT

Priscila Antunes Schamne. Effect of additives in rice substrate for conidial production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

The culture media increment with different sources of carbon and nitrogen, mainly media made with plant products, has been studied with the objective of increase productivity of entomopathogenic fungi. Thus, this study aimed to evaluate the effect of additives at the production of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in rice substrate. The production and conidia viability at solid rice medium were evaluated using different additives: potato broth (5%, 10%, 15% and 20%), lactose (1 g, 2 g, 3 g and 4 g), yeast extract (0.005 g, 0.01 g and 0.1 g), salts like: NaNO<sub>3</sub>; KCl; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and ascorbic acid 0.01 g. Each treatment had four repetitions, with a control treatment consisting only of rice substrate. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by regression and Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). It was found that increasing the concentration of additives at culture rice medium, it was caused a small decrease at conidia production of both fungi studied, except at the treatment with yeast extract 0.005 g lactose 1 g which there was an increase at production of *M. anisopliae* ( $2.31 \times 10^8$  and  $1.89 \times 10^8$  conídios.g<sup>-1</sup>, respectively). Conidia viability was not affected by additives at culture medium. The addition of 0.01 g of KCl increased the production of *M. anisopliae* and the other treatments did not affect the production of this fungus. The addition of mineral salts at the medium did not affect the production of *B. bassiana*. Conidial germination of *M. anisopliae* was not affected by the addition of mineral salts at the culture medium. But for *B. bassiana*, the treatment with NaNO<sub>3</sub> differed statistically from the treatments with MgSO<sub>4</sub> and KCl, the other treatments showed no significant differences compared to control treatment.

Keywords: microbial control; mass production; entomopathogenic fungi.

## 1. INTRODUÇÃO

Após dezenas de anos de pesquisas e emprego de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas, pode-se dizer que estes agentes ainda são pouco utilizados, em relação aos inseticidas químicos convencionais. Apesar das dificuldades, os fungos entomopatogênicos têm seu espaço no mercado fitossanitário e são utilizados com frequência em algumas culturas no Brasil (Alves et al., 2008).

Porém, ainda existem limitações para a aplicação desses, tais como a produção massal e a forma de conservação que permita a manutenção da patogenicidade e virulência pelo menos por dois anos, em condições de fácil armazenamento e aplicação (Almeida et al., 2007). Por isso, o aprimoramento das técnicas de produção massal dos fungos entomopatogênicos torna-se necessário.

Dentre os gêneros mais estudados encontram-se *Metarhizium* e *Beauveria* (Shah & Pell, 2003), devido à vasta gama de hospedeiros que podem ser controlados por estes fungos e pela facilidade de produção em laboratório (Alves, 1998).

O fungo *Metarhizium anisopliae* vem sendo produzido no Brasil em escala comercial desde 1969 (Alves, 1998) e até hoje o meio de cultura mais utilizado para a produção deste e de outros fungos entomopatogênicos é o arroz. Pesquisas vêm sendo feitas com substratos alternativos como amido de milho, aveia em flocos, canjiquinha, farelo de trigo, farinha de mandioca crua, farinha de milho amarela, fubá, milho em grãos, polvilho azedo, soja em grãos e trigo moído. Porém, o meio mais produtivo para *M. anisopliae* e *B. bassiana* ainda é o arroz (Otati-de-Lima, 2007).

Segundo Leite et al. (2003a), as técnicas de produção massal de fungos entomopatogênicos devem buscar o baixo custo e a obtenção de alta concentração de formas viáveis e infectivas do patógeno. A primeira etapa, no desenvolvimento de um meio de cultura é a seleção de um meio definido que proporcione uma boa produção do fungo. A seguir deve-se variar os nutrientes e avaliar o seu impacto na produção do patógeno, bem como a sua estabilidade e virulência (Jackson, 1997).

Neste sentido, o incremento de meios de cultura com diversas fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais tem sido estudado com o objetivo de aumentar a produtividade de fungos entomopatogênicos. Cintra et al. (1999), observaram que a adição de lactose ao meio de cultura de arroz aumentou a produção de conídios de *M. anisopliae*. Outras fontes de açúcar como glicose, sacarose e maltose também podem aumentar a produção de fungos entomopatogênicos (Thomas et al., 1987; Rombach, 1989).

Meios de cultura contendo extrato de levedura também proporcionam um aumento na produção de conídios (Rombach, 1989; Cintra et al., 1999). Sais minerais podem incrementar a produção de entomopatogênicos, como *B. bassiana* (Cintra et al., 1999), resultados obtidos por Leite et al. (2003b) demonstram aumento na produção de *Batkoa* sp, *Furia* sp e *Neozygites* sp. Outras substâncias podem ser utilizadas buscando maior produtividade, como lecitina e ácido láctico (Kleespies & Zimmermann, 1998).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de caldo de batata, lactose, extrato de levedura, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, nitrato de sódio, cloreto de cálcio e ácido ascórbico, como diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais em meio sólido de arroz na produção de conídios dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Local do experimento**

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Entomologia e de Fitopatologia do departamento de Agronomia da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO (Guarapuava, PR).

### **2.2. Obtenção dos isolados**

Os isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (MA/037) e *Beauveria bassiana* (UNI/65) provenientes da Universidade Estadual de Londrina – UEL e Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, respectivamente, foram armazenados na forma de conídios a -4°C.

### **2.3. Repicagem dos fungos entomopatogênicos**

Para a realização dos experimentos os fungos foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) segundo metodologia de Alves (1998) e mantidos em câmara climatizada a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ; fotoperíodo de 12 horas e UR  $70\pm 10\%$ .

#### **2.4. Efeito da adição de batata, lactose e extrato de levedura na produção de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae***

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram produzidos em arroz pré-cozido mantido em garrafas de vidro de 200 mL conforme metodologia proposta por Alves (1998). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, os tratamentos testados foram: arroz (testemunha); batata (5, 10, 15 ou 20%); lactose (1, 2, 3 ou 4 g) e extrato de levedura (0,005; 0,01 ou 0,05 g).

Garrafas de vidro (200 mL) com 40 g de arroz, 15 mL de água destilada e o respectivo tratamento foram autoclavadas a 1 atm e 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento foi inoculado 5 mL da suspensão de conídios, na concentração  $7,3 \times 10^6$  e  $3,7 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente.

As garrafas foram mantidas em câmara climatizada a 25±1°C; fotoperíodo de 12 horas e UR 70±10% durante 14 dias. Após esse período as garrafas foram mantidas a -4 °C por no máximo três dias para a avaliação da produção e viabilidade dos conídios.

#### **2.5. Efeito de sais minerais na produção de conídios dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em arroz**

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram produzidos em meio sólido de arroz conforme metodologia descrita anteriormente. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo os tratamentos: NaNO<sub>3</sub>; KCl; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e ácido ascórbico, todos na concentração de 0,01 g e o tratamento testemunha foi o substrato de arroz.

Garrafas de vidro (200 mL) com 40 g de arroz, 15 mL de água destilada para *M. anisopliae* e 10 mL para *B. bassiana* e o respectivo tratamento foram autoclavadas a 1 atm e 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento foi inoculado 5 mL da suspensão de conídios, na concentração  $3,0 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

As garrafas foram mantidas em câmara climatizada a 25±1°C; fotoperíodo de 12 horas e UR 70±10% durante 14 dias. Após esse período as garrafas foram mantidas a -4 °C por no máximo 3 dias para a avaliação da produção e viabilidade dos conídios.

## **2.6. Produção de conídios**

De cada repetição foi retirada uma amostra de 1 g do substrato+fungo que foi suspensa em 10 mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo (Tween 80<sup>®</sup>-0,01%). Os conídios foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer conforme metodologia adaptada de Alves (1998).

## **2.7. Viabilidade de conídios**

Para determinação da viabilidade dos conídios, 0,1 mL de suspensão fúngica padronizada na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas plásticas contendo meio ágar-água. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; fotoperíodo de 12 horas e UR  $70 \pm 10\%$ . Após 24 horas a porcentagem de conídios germinados e não germinados foi quantificada sob microscópio óptico conforme metodologia adaptada de Alves (1998).

## **2.8. Análise estatística**

Todos os parâmetros foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por teste de Tukey e por regressão quando cabível ( $P \leq 0,05$ ) utilizando o programa Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira, 2000). Os dados em porcentagem de germinação foram transformados para arcoseno ( $\sqrt{x/100}$ ).

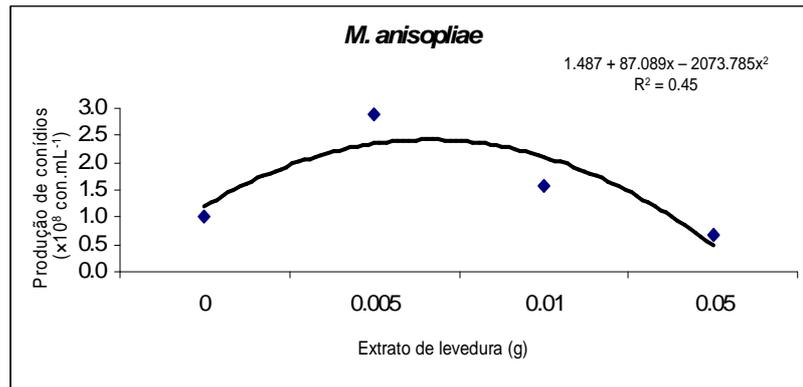
# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1. Efeito da adição de batata, lactose e extrato de levedura na produção de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae***

### **3.1.1. Produção de conídios**

De maneira geral, pode-se observar que o aumento na concentração dos aditivos no meio de cultura proporcionou uma pequena redução na produção de conídios de ambos os fungos avaliados (Figuras 1 à 5).

O incremento na produção de conídios de *M. anisopliae* ocorreu na menor concentração de extrato de levedura (0,005 g), a qual foi aproximadamente o dobro da produção do tratamento testemunha, sendo a maior produção de conídios desse fungo em todos os tratamentos avaliados, com  $2,31 \times 10^8$  conídios.g<sup>-1</sup> (Figura 1), ao contrário do observado por Cintra et al. (1999), em que o extrato de levedura também foi testado, porém o maior aumento da conidiogênese ocorreu com a lactose.

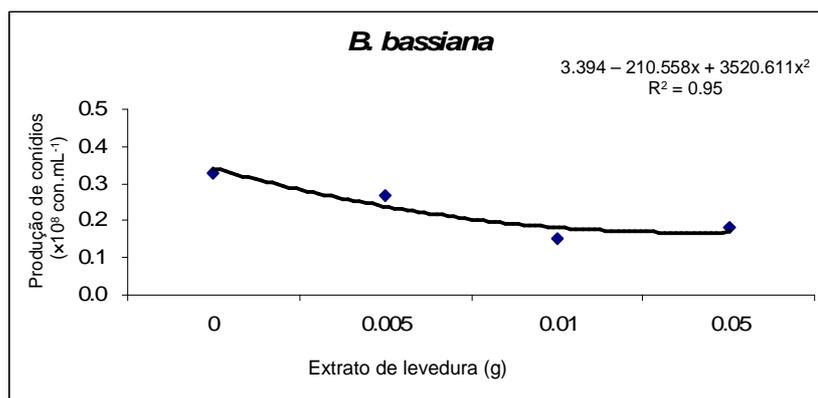


**Figura 1.** Produção de conídios de *M. anisopliae* (MA/037) em meio sólido de arroz enriquecido com extrato de levedura em diferentes concentrações, após 14 dias de crescimento ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12h fotoperíodo e  $70 \pm 10\%$  UR).

A concentração de 0,01 g de extrato de levedura também incrementou a produção de conídios de *M. anisopliae*, sendo em torno de 30% superior ao tratamento testemunha. Estes resultados estão de acordo com Cintra et al. (1999) que também observaram um incremento na produção de *M. anisopliae*, com essa mesma concentração de extrato de levedura. Em outro estudo, Rombach (1989) obteve maior produção com extrato de levedura 0,5%.

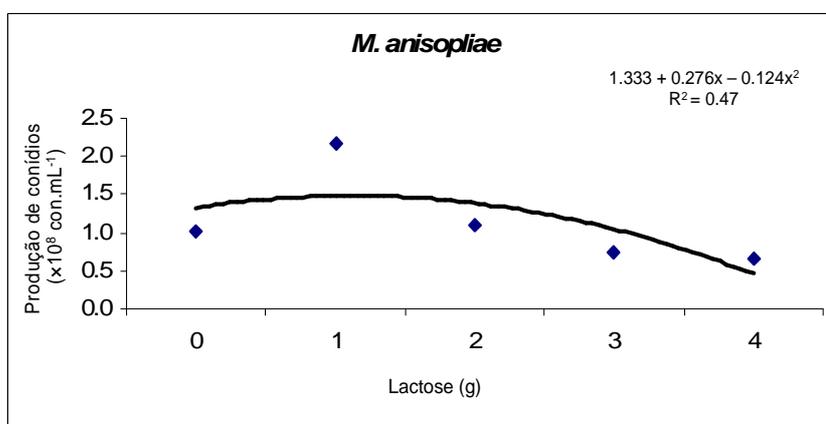
Por outro lado, a maior concentração (0,05 g) causou uma redução na produção de conídios de *M. anisopliae* de aproximadamente 45% em relação ao tratamento testemunha.

Para *B. bassiana*, nenhum dos aditivos testados aumentou a produção de conídios, indicando que a adição dessas substâncias ao meio de cultura não favorece a produção desse fungo (Figuras 2, 4 e 5). Esse resultado também foi observado por Cintra et al. (2000) em que apenas os tratamentos com sais minerais apresentaram aumento significativo na conidiogênese de *B. bassiana*, os demais tratamentos obtiveram valores semelhantes à testemunha.



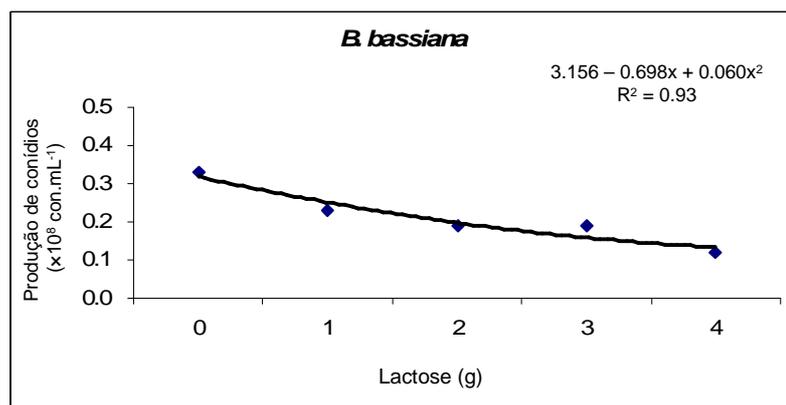
**Figura 2.** Produção de conídios de *B. bassiana* (UNI/65) em meio sólido de arroz enriquecido com extrato de levedura em diferentes concentrações, após 14 dias de crescimento ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 12h fotoperíodo e  $70\pm 10\%$  UR).

A adição de lactose na concentração de 1 g ao meio de cultura proporcionou um aumento na produção de conídios de *M. anisopliae* de aproximadamente 70%, em relação à testemunha (Figura 3).



**Figura 3.** Produção de conídios de *M. anisopliae* (MA/037) em meio sólido de arroz enriquecido com lactose em diferentes concentrações, após 14 dias de crescimento ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 12h fotoperíodo e  $70\pm 10\%$  UR).

Por outro lado, para o fungo *B. bassiana* as concentrações 1 e 2 g de lactose, causaram uma redução de aproximadamente 10 e 40%, respectivamente, em relação ao tratamento testemunha. As demais concentrações estudadas (3 e 4 g) causaram reduções significativas na produção de conídios para ambos os fungos (Figura 4).

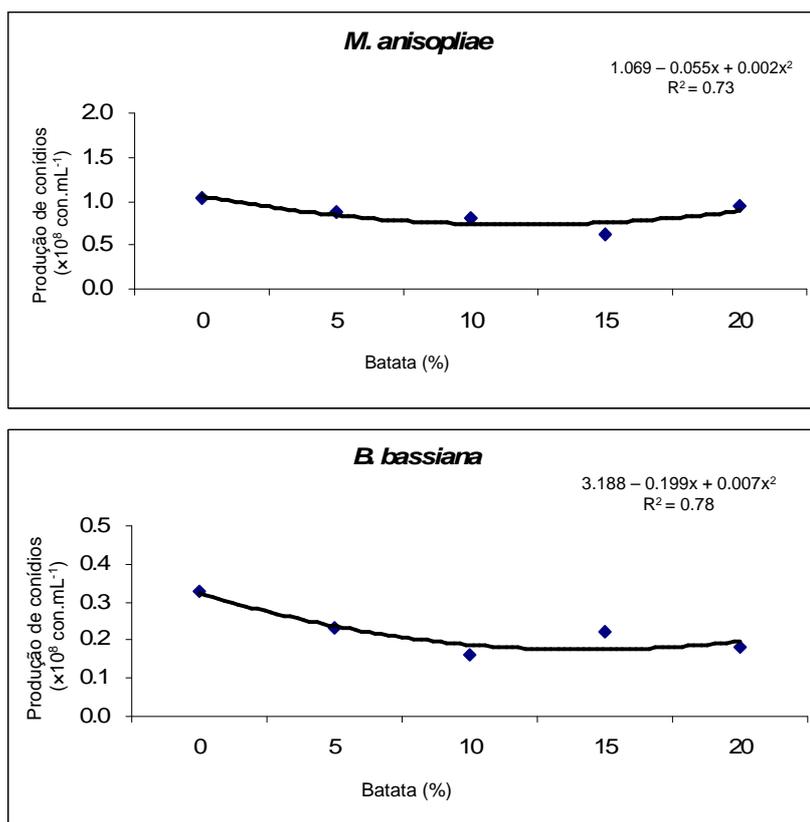


**Figura 4.** Produção de conídios de *B. bassiana* (UNI/65) em meio sólido de arroz enriquecido com lactose em diferentes concentrações, após 14 dias de crescimento ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 12h fotoperíodo e  $70\pm 10\%$  UR).

Uma maior produção de conídios também foi obtida por Leite et al. (2003a) com a adição de 1 a 3% de lactose na água do pré-cozimento de arroz, permitindo um aumento na produção de até quatro vezes para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Rombach (1989) também observou que a produção máxima de conídios de *B. bassiana* ocorreu em meio contendo sacarose 2%. No presente estudo isso não foi observado, provavelmente essa variação de produtividade se deve a diferentes metodologias e isolado de fungos utilizados.

A maior produção de *M. anisopliae* foi observada na menor concentração de lactose, indicando que baixas concentrações de açúcar favorecem o seu crescimento. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Pereira & Eira (1999), onde observaram que a menor concentração de açúcar ( $2,0\text{g.L}^{-1}$ ) produziu o dobro do número de conídios por grama de substrato em relação à maior concentração testada ( $10,0\text{g.L}^{-1}$ ).

Nos tratamentos em que foi adicionado o caldo de batata, todas as concentrações estudadas (5, 10, 15, 20%) causaram redução na produção de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando comparada ao tratamento testemunha, apresentado produção máxima de  $1,01\times 10^8$  e  $0,27\times 10^8$  conídios. $\text{g}^{-1}$ , respectivamente (Figura 5). Segundo Leite et al. (2003a), os meios ricos em carbono tendem a produzir maior quantidade de formas vegetativas como blastosporos, corpos hifais e micélio, o que pode levar a baixa produção de conídios destes fungos encontrada neste tratamento.



**Figura 5.** Produção de conídios de *M. anisopliae* (MA/037) e *B. bassiana* (UNI/65) em meio sólido de arroz enriquecido com caldo de batata em diferentes concentrações, após 14 dias de crescimento ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 12h fotoperíodo e  $70\pm 10\%$  UR).

Em todos os tratamentos estudados, o fungo *B. bassiana* teve menor produção de conídios quando comparado ao fungo *M. anisopliae*, apresentando produção média de  $0,22 \times 10^8$  e  $1,12 \times 10^8$  conídios.g $^{-1}$  de substrato, respectivamente. Apesar dos métodos utilizados serem os mesmos, Potrich et al. (2006) sugere que a diferença pode estar relacionada a pequenas variações no substrato, teor de umidade, quantidade de meio no recipiente, quantidade e qualidade do inóculo, além de serem espécies diferentes.

### 3.1.2. Viabilidade de conídios

Quanto à germinação dos conídios, verificou-se que os aditivos adicionados ao meio de cultura não afetaram a germinação de ambos os fungos avaliados quando comparados ao tratamento testemunha. A análise de variância não se mostrou significativa, indicando que não houve diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos para ambos os fungos.

Observou-se que o fungo *M. anisopliae* obteve percentual de germinação acima de 90% em todos os tratamentos e *B. bassiana* obteve percentual acima de 70% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Viabilidade dos conídios (médias±EP) de *M. anisopliae* (MA/037) e *B. bassiana* (UNI/65) produzidos em meio sólido de arroz enriquecido com diferentes aditivos (25±1°C, 12h fotoperíodo e 70±10% UR).

Tratamentos	Germinação de conídios (%)	
	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
Testemunha	94,69±0,02 <sup>ns</sup>	84,69±0,03 <sup>ns</sup>
Batata 5%	94,19±0,02 <sup>ns</sup>	80,06±0,05 <sup>ns</sup>
Batata 10%	92,25±0,01 <sup>ns</sup>	78,38±0,06 <sup>ns</sup>
Batata 15%	92,19±0,03 <sup>ns</sup>	72,75±0,05 <sup>ns</sup>
Batata 20%	94,38±0,004 <sup>ns</sup>	78,44±0,02 <sup>ns</sup>
Lactose 1 g	93,31±0,02 <sup>ns</sup>	80,13±0,03 <sup>ns</sup>
Lactose 2 g	95,81±0,01 <sup>ns</sup>	77,50±0,08 <sup>ns</sup>
Lactose 3 g	94,38±0,03 <sup>ns</sup>	82,06±0,08 <sup>ns</sup>
Lactose 4 g	96,81±0,01 <sup>ns</sup>	83,00±0,06 <sup>ns</sup>
Extrato de Levedura 0,005 g	95,13±0,02 <sup>ns</sup>	82,38±0,06 <sup>ns</sup>
Extrato de Levedura 0,01 g	95,31±0,01 <sup>ns</sup>	81,75±0,04 <sup>ns</sup>
Extrato de Levedura 0,05 g	95,44±0,02 <sup>ns</sup>	84,25±0,04 <sup>ns</sup>

ns – não significativo pela análise de variância (P≤0,05)

O maior percentual de germinação de *M. anisopliae* ocorreu com lactose 4 g e o menor no tratamento batata 15%. Para *B. bassiana*, o maior percentual de germinação obtido foi no tratamento testemunha e o menor foi observado no tratamento batata 15%.

Vários resultados demonstram que o incremento dos substratos não afeta a germinação de conídios ou blastosporos de fungos entomopatogênicos. Neste sentido, Kleespies & Zimmermann (1998), verificaram que a viabilidade dos blastosporos de *M. anisopliae* produzidos em meio contendo aditivos foi semelhante aos produzidos pela testemunha.

Pereira & Eira (1999) também observaram que a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* não foi influenciada pelas diferentes concentrações de açúcar utilizadas no meio de cultivo. Rombach (1989) constatou que mais de 95% dos conídios de *B. bassiana* germinaram após serem produzidos em meio contendo sacarose 2% e extrato de levedura 0,5%.

Os tratamentos com extrato de levedura não obtiveram maiores percentuais de germinação. Entretanto, Wenzel et al. (2007) relata que o extrato de levedura é bastante utilizado como fonte de nitrogênio e aminoácidos para incrementar o crescimento e a conidiogênese dos fungos.

O fungo *B. bassiana* apresentou os menores valores de germinação quando comparado ao fungo *M. anisopliae*. Além de se tratar de espécies diferentes, isso está relacionado ao fato

de *B. bassiana* ser mais exigente que *M. anisopliae*. Assim, como os testes de viabilidade foram realizados com um meio pobre (AA), limitou a germinação desse fungo.

### 3.2. Efeito de sais minerais na produção de conídios dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em arroz

#### 3.2.1. Produção de conídios

Poucos estudos se referem aos efeitos dos sais na produção de fungos entomopatogênicos. No presente estudo, constatou-se que a adição de sais minerais no meio de cultura afetou a produção de conídios de ambos os fungos avaliados (Tabela 2).

A adição de 0,01 g de KCl ao meio de cultura proporcionou um aumento de 78% na produção de conídios de *M. anisopliae*, em relação à testemunha. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Cintra et al. (2000), que observaram um aumento na conidiogênese deste fungo na adição KCl. Os demais sais adicionados ao meio de cultura não apresentaram diferenças significativas na conidiogênese de *M. anisopliae* em relação à testemunha (Tabela 2). Estes resultados diferem dos resultados obtidos por Cintra et al. (2000), que observaram aumento na produção deste fungo com a adição de NaNO<sub>3</sub> e ácido ascórbico.

**Tabela 2.** Produção de conídios (médias±EP) de *M. anisopliae* (MA/37) e *B. bassiana* (UNI/65) em meio sólido de arroz enriquecido com sais minerais, após 14 dias de crescimento (25±1°C, 12h fotoperíodo e 70±10% UR).

Tratamentos	Número de conídios (×10 <sup>8</sup> conídios.g <sup>-1</sup> )	
	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
Testemunha	2,31±0,09 a	2,51±0,06 ab
KCl	4,12±0,26 b	2,70±0,30 ab
CaCl <sub>2</sub>	2,90±0,78 a	1,97±0,31 a
NaNO <sub>3</sub>	3,47±0,25 a	3,04±0,28 ab
MgSO <sub>4</sub>	2,93±0,33 a	3,19±0,34 b
Ácido ascórbico	2,01±0,33 a	3,17±0,19 b

Letras seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Para o fungo *B. bassiana*, a adição de sais minerais ao meio de cultura não apresentou diferenças significativas em relação à testemunha. Os tratamentos ácido ascórbico e MgSO<sub>4</sub>

apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento CaCl<sub>2</sub>, que obteve menor produção ( $1,97 \times 10^8$  conídios.g<sup>-1</sup>).

Leite et al. (2003b) observaram que o meio contendo os sais CaCl<sub>2</sub>, KCl e MgSO<sub>4</sub> obteve maior produção dos fungos entomopatogênicos *Batkoa* sp, *Furia* sp e *Neozygites* sp. em relação ao tratamento testemunha. Estes resultados diferem dos obtidos com os fungos estudados, onde apenas KCl aumentou a produção de *M. anisopliae*, já para *B. bassiana* nenhum dos sais obteve maior produção que o tratamento testemunha, isso se deve provavelmente por se tratar de espécies diferentes e indica que cada espécie requer nutrientes específicos para o seu crescimento.

### 3.2.2 Viabilidade de conídios

O fungo *M. anisopliae* apresentou bons percentuais de germinação, acima de 95%, e os sais minerais adicionados ao meio de cultura não afetaram a germinação deste patógeno, pois a análise de variância não foi significativa, indicando que não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Viabilidade dos conídios (médias±EP) de *M. anisopliae* (MA/037) e *B. bassiana* (UNI/65) produzidos em meio sólido de arroz enriquecido com sais minerais (25±1°C, 12h fotoperíodo e 70±10% UR).

Tratamentos	Germinação de conídios (%)	
	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>
Testemunha	98,31±0,28 <sup>ns</sup>	79,50±1,55 ab
KCl	97,94±0,26 <sup>ns</sup>	80,83±0,56 b
CaCl <sub>2</sub>	97,81±0,56 <sup>ns</sup>	79,83±1,51 ab
NaNO <sub>3</sub>	98,31±0,70 <sup>ns</sup>	73,75±3,58 a
MgSO <sub>4</sub>	98,25±0,40 <sup>ns</sup>	81,00±0,53 b
Ácido ascórbico	98,56±0,33 <sup>ns</sup>	75,33±2,10 ab

Letras seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P≤0,05).

ns – não significativo

Para o fungo *B. bassiana*, não foi observada diferença significativa na germinação dos conídios com a adição de sais minerais ao meio de cultura, em relação ao tratamento testemunha. No entanto, entre os tratamentos observou-se diferenças estatisticamente significativas quanto à germinação dos conídios, sendo que o tratamento NaNO<sub>3</sub> apresentou o

menor percentual (73,75%) e diferiu dos tratamentos KCl e MgSO<sub>4</sub> (Tabela 3). Já a maior germinação foi observada no tratamento sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 81%.

Segundo Consolo et al. (2003) um dos maiores desafios para o sucesso no uso de fungos como agentes de controle biológico é a infectividade e a persistência do conídio no meio ambiente. Neste trabalho foram avaliados parâmetros quantitativos (crescimento vegetativo e produção de conídios por área/massa de meio) e qualitativos (capacidade de germinação do conídio) na busca de melhorias no substrato de crescimento do fungo. A capacidade de mortalidade em artrópodes pragas, dos conídios produzidos nestes diferentes meios enriquecidos é um aspecto que será explorado em trabalhos futuros, pois nem sempre grande quantidade de conídios se reflete em capacidade infectiva.

#### 4. CONCLUSÕES

- A adição de extrato de levedura (0,005 g) e lactose (1 g) aumentou a produção de *M. anisopliae*. Os demais tratamentos adicionados ao meio de cultura de arroz reduziram a produção de conídios de ambos os fungos estudados.
- As fontes de carbono e nitrogênio não afetaram a germinação de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.
- A adição de 0,01 g de KCl ao meio de cultura com 40 g de arroz aumentou a produção de *M. anisopliae*, os demais tratamentos não afetaram a produção deste fungo.
- A adição de sais minerais ao meio de cultivo não afetou a produção de conídios de *B. bassiana*.
- A germinação dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* não foi afetada pela adição de sais minerais ao meio de cultura.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.E.M.; ROCHA, T.C.; BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.4, p.369-371, out./dez., 2007.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

CINTRA, E.R.R.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Efeito de aditivos no meio de cultura de arroz para a produção de *Beauveria bassiana*. *Resumos...* São Paulo: **Arquivos do Instituto Biológico**, 2000. v.67, p.110.

CINTRA, E.R.R.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Efeito de aditivos no meio de cultura de arroz para a produção de *Metarhizium anisopliae*. *Resumos...* São Paulo: **Arquivos do Instituto Biológico**, 1999. v.66, p.100.

CONSOLO, V.F.; SALERNO, G.L.; BERON, C.M. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. **BioControl**, Mar del Plata, v.48, n.6, p.705-712, dec. 2003.

FERREIRA, D.F. 2000. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>>. acesso em: 02 ago 2008.

JACKSON, M.A. Optimizaing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, p.180-187, 1997.

KLEESPIES, R.G.; ZIMMERMANN, G. Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, n.2, p.207-214, jun. 1998.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Livroceres, 2003a. 92p.

LEITE, L.G.; ALVES, S.B.; BATISTA FILHO, A.; ROBERTS, D.W. Effect of salts, vitamins, sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of Entomophthorales: *Batkoa*, *Furia*, and *Neozygites*. **Mycological Research**, v.107, n.7, p. 872-878, jul. 2003b.

OTATI-DE-LIMA, E.L. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos**. 2007.

92 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, SP.

PEREIRA, S.R.M.; EIRA, A.F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sokorin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.389-394, 1999.

POTRICH, M.; ALVES, L.F.A; MERTZ, N.R.; SILVA, E.R.L.da. Avaliação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para controle de *Sitophilus zeamai* (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay**, Piracicaba, v.1, p.1-12, dez. 2006.

ROMBACH, M. C. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina. Hyphomycetes) Symptoduloconidia in submerged culture. **Entomophaga**, v.34, n.1, p.45-52, mar. 1989.

THOMAS, K.C.; KHACHATOURIANS, G.G.; INGLEDEW, W.M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, n.1, p.12-20, 1987.

WENZEL, I.M; MONTEIRO, A.C; PEREIRA, G.T. Desempenho de *Lecanicillium lecanii* em meios de cultura contendo vitaminas e concentrações de extrato de levedura. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.3, p.413-421, 2007.