

INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES NO CRESCIMENTO, GERMINAÇÃO  
E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae*  
(METSCH.) SOROKIN

Alda Luiza Loureiro dos Santos <sup>1</sup>  
João Lúcio de Azevedo <sup>2</sup>  
Issao Shirose <sup>1</sup>

INTRODUÇÃO

As cigarrinhas (Homoptera - Cercopidae) atacam as pastagens, constituindo-se em um dos sérios problemas para a pecuária em diversas regiões do país; também para a cana-de-açúcar, os prejuízos causados pelo inseto nas áreas mais infestadas, como os estados de Pernambuco e Alagoas, são ainda incalculáveis, não só pela extensão da área, como também pela intensidade de infestação.

Considerando que os inseticidas já não têm uma ação eficaz devido ao aparecimento de raças resistentes do inseto, de já se ter constatado a grande ação tóxica dos mesmos sobre os animais e o próprio homem, além do fato de que sua aplicação em plantações de cana-de-açúcar e em pastagens, que ocupam grandes áreas, torna-se uma medida muitas vezes anti-econômica, tem-se partido para a utilização do controle microbiológico de pragas.

---

<sup>1</sup> Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

<sup>2</sup> Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.

Dentre os microrganismos entopatogênicos conhecidos, o fungo *Metarhizium anisopliae* mostrou-se o mais eficiente contra as cigarrinhas (GUAGLIUMI, 1970, 1971, 1972; MARQUES & VILAS BOAS, 1973). Entretanto, sua utilização em larga escala pode ser prejudicada pelo pouco conhecimento de alguns aspectos de sua biologia, especialmente, de isolados brasileiros.

Dessa forma, este trabalho se propõe a estudar em uma linhagem de *M. anisopliae*, que será designada de A e que está sendo usada nos experimentos de campo em vários Institutos de Pesquisa no Brasil, alguns aspectos biológicos como crescimento em temperaturas elevadas, efeito de diferentes intensidades de luz no crescimento e na produção de conídios e a determinação do meio de cultura no qual o fungo melhor se desenvolva.

## MATERIAL E MÉTODOS

### A. Efeito da temperatura na germinação

Suspensão de conídios, obtidos das colônias incubadas por oito dias em placas de Petri contendo meio completo (PONTECORVO e col., 1953) foi preparada em solução de Tween 80 (0,1% v/v). Através de hematímetro estimou-se o número de conídios em cerca de  $10^6 - 10^7$  / ml. Dessa suspensão foram feitas diluições convenientes de modo a se obter uma concentração aproximada de 100 conídios por placa de Petri. Alíquotas contendo esse número de conídios foram semeadas em 15 placas de Petri, sendo duas delas incubadas a 28°C e as restantes a 37°C, as quais foram sendo retiradas duas a duas, a partir de 24 horas nesta temperatura e passadas para 28°C; no quinto dia de incubação a 37°C as últimas cinco placas foram retiradas e incubadas a 28°C.

Após cinco dias de incubação, efetuou-se a contagem tanto das colônias das placas mantidas a 28°C, como daquelas retiradas diariamente de 37°C e transferidas para 28°C.

### B. Efeito da luz na taxa de crescimento

De uma suspensão de conídios preparada como descrito no ítem anterior, efetuou-se a semeadura das mesmas com o auxílio de um fio de platina, molhando-o na suspensão e inoculando-o no centro das placas de Petri contendo meio completo. Foram utilizadas quinze placas, sendo cinco delas colocadas sob luz contínua, cinco sob luz alternada e cinco em escuro total.

A luminosidade total foi obtida através de três lâmpadas incandescentes de 60W e quatro lâmpadas fluorescentes, ficando as mesmas a uma altura de 60cm da bancada onde se situaram as placas. A luminosidade alternada foi obtida cobrindo-se as placas, que ficaram na mesma bancada, com tecido preto a cada 12 horas. Na sala existia um sistema de ar condicionado a fim de manter a temperatura a 28°C.

Efetuaram-se medições diárias dos diâmetros das colônias a partir do terceiro, até o sétimo dia de incubação

### C. Efeito da luz na produção de conídios

De suspensões de conídios preparadas como descrito no ítem A foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e semeadas em 15 placas de Petri, sendo cinco delas colocadas sob luz contínua, cinco sob luz alternada e cinco em escuro total, nas mesmas condições descritas no ítem anterior.

Após o terceiro dia de germinação e, diariamente, até o sétimo dia, foram retiradas duas amostras de cada placa. Essas amostras constituíam-se em discos de meio de cultura, contendo o fungo em crescimento, obtidos com o auxílio de um furador de rolha, de 7mm de diâmetro.

Cada disco foi colocado, separadamente, em um tubo de ensaio contendo 2,5 ml de Tween 80. Após agitação dos

tubos durante 1 minuto, retiraram-se alíquotas e o número de conídios foi estimado em hematímetro.

#### D. Germinação em diferentes meios de cultura

De suspensões preparadas como descrito no ítem A, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e colocadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura, resultando na concentração adequada para se obter cerca de 50 conídios por campo de microscópio.

Foram usados três meios de cultura líquidos: meio completo, batata-dextrose e meio de arroz (AQUINO, 1974), os quais foram distribuídos em quinze tubos de ensaio, sendo cinco tubos contendo 10 ml de cada meio de cultura.

A partir da primeira hora de incubação, a 28°C até a 12ª hora, retiraram-se alíquotas dos tubos contendo os diversos meios de cultura, efetuando-se a contagem dos conídios germinando, em lâminas de microscópio, de um total de 50 conídios por campo.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### A. Efeito da temperatura na germinação

Como pode ser verificado no quadro I, a linhagem A de *M. anisopliae* comportou-se diferentemente quando incubada a 28°C e 37°C, observando-se crescimento apenas nas placas incubadas a 28°C cujas colônias apresentava tamanho bem grande.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por BALFOUR-BROWNE (1960), MASERA (1957) e DIOMANDE (1969), os quais mostraram que a temperatura ótima para o cresci-

QUADRO I - Número de colônias obtidas após incubação de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* a 28°C e 37°C.

	37°C	28°C	37°C → 28°C				
			Dias				
			1	2	3	4	5
Médias	0	98	84,0	42,5	10,0	0,0	0,0
Porcentagens	0	100	85,7	43,3	10,2	0,0	0,0

\* As placas incubadas a 37°C foram sendo retiradas diariamente e colocadas a 28°C.

mento do fungo está entre 25°C e 30°C e a máxima entre 32°C e 34°C.

Verifica-se que as placas re-incubadas a 28°C, após terem permanecido durante 24, 48 e 72 horas a 37°C, apresentaram um número menor e decrescente de colônias em relação às obtidas a 28°C, enquanto que as placas mantidas por 96 a 120 horas a 37°C, mesmo após cinco dias de re-incubação a 28°C, não apresentaram crescimento algum.

VEEN (1968) verificou que até 42°C, não há morte dos esporos mas que exposições de esporos a 50°C por 5 minutos eram suficientes para inibir a germinação. Concluiu que os esporos parecem ter um ponto termal de morte relativamente baixo. No presente trabalho, entretanto, verificou-se que a temperatura de 37°C, nas condições utilizadas, por 96 horas ou mais, já é suficiente para causar a morte dos esporos. O conhecimento desse dado para a linhagem A de *M. anisopliae* é importante por ser esta a linhagem utilizada em experimentos de controle biológico em regiões do Brasil cuja média anual de temperatura é alta. Assim, para um controle mais efetivo, po

der-se-ia pensar no isolamento de linhagens já resistentes à temperaturas existentes na natureza ou um melhoramento genético do fungo por indução, através de agentes mutagênicos, de mutantes com maior resistência a temperaturas elevadas ou por recombinação com outras linhagens que tenham essa característica, e seleção dos recombinantes desejados. Deve-se objetivar ainda, as diferentes regiões do Brasil onde se deverá aplicar o fungo, a fim de uma possível utilização nas mesmas, de linhagens de *M. anisopliae* adaptadas à temperatura de cada uma delas.

### B. Efeito da luz na taxa de crescimento

A figura 1 evidencia as curvas de crescimento obtidas através da média dos diâmetros das colônias provenientes de placas incubadas sob luz contínua, luz alternada e escuro total. O quadro II sumariza a diferença de crescimento em centímetros entre o 3º e 7º dia de incubação a partir da média dessas colônias.

Aplicou-se o teste F, de acordo com a fórmula proposta por PIMENTEL GOMES (1963), resultando o mesmo significativo ao nível de 5% de probabilidade, indicando que existem, provavelmente, diferenças entre tratamentos para a taxa de crescimento. O teste de Tukey (quadro II) mostrou que na ausência de luz, a taxa de crescimento da linhagem utilizada de *M. anisopliae*, não diferiu significativamente em relação ao tratamento com luz alternada sendo, entretanto, diferente estatisticamente do tratamento com luz contínua. Este último, por sua vez, não difere estatisticamente do tratamento com luz alternada para o caráter taxa de crescimento

Há uma forte evidência, portanto, de que o escuro propicia melhor crescimento do fungo do que a luz contínua. Ao maior crescimento das colônias mantidas no escuro deve-se adicionar ainda, o desenvolvimento micelial muito grande, ficando as colônias com micélio branco, abundante e de aspecto cotonoso. As colônias submetidas

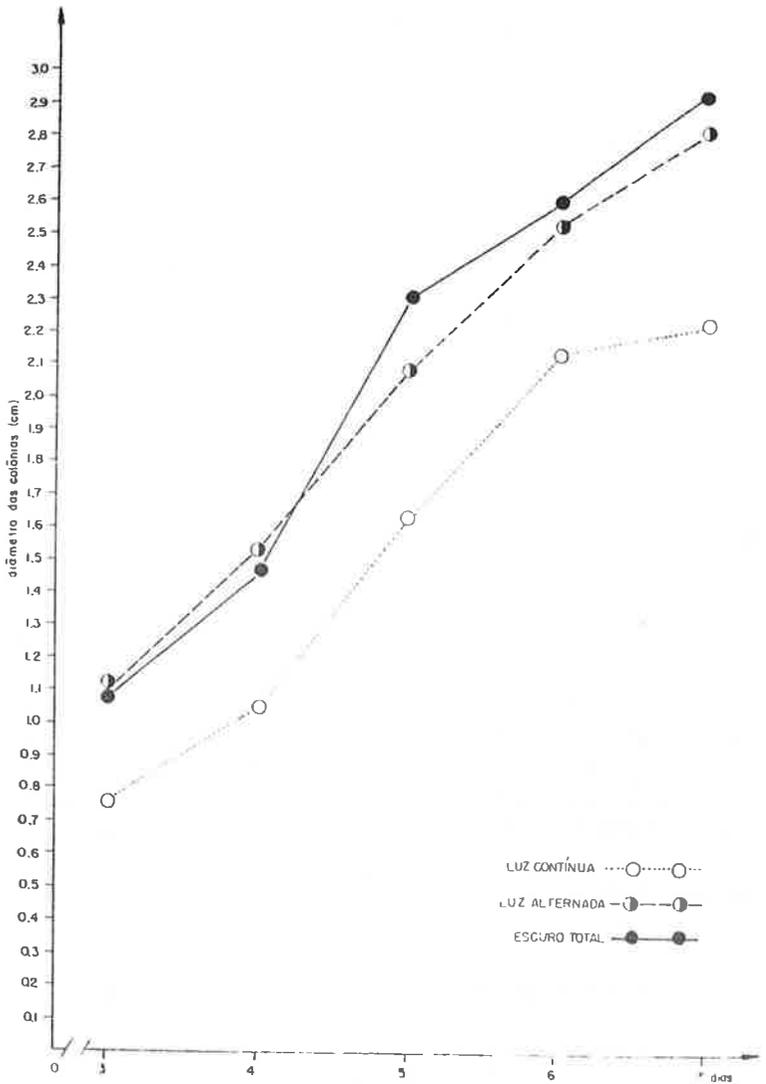


FIGURA 1. Curvas de crescimento da linhagem A de *M. anisopliae* submetida a diferentes intensidades de luz.

QUADRO 11 - Total de crescimento das colônias (em cm) da linhagem A de *M. anisopliae* entre o 3º e o 7º dia de incubação sob luz contínua, alternada e escuro total

Repetições	Luz		Escuro
	Contínua	Alternada	
1	1,5	1,7	1,9
2	1,2	1,5	1,9
3	1,9	1,9	1,9
4	1,2	1,9	1,7
5	1,6	-	2,0
TOTAL	7,4	7,0	9,4
MÉDIA	1,48b*	1,73ab	1,88a

\* Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

ã luz alternada ficaram intermediárias entre os outros dois tratamentos, sendo que a taxa de crescimento e o desenvolvimento micelial das colônias mantidas sob luz contínua foram bem menores. Esses dados concordam com os de MÜLLER-KÖGLER (1967), o qual observou que a porcentagem de germinação do fungo, nas primeiras 24 horas de germinação, foi mais elevada no escuro do que na luz.

### C. Efeito da luz na produção de conídios

A figura 2 evidencia as curvas de produção de conídios obtidos de colônias submetidas a diferentes intensidades luminosas.

Verifica-se que o número de conídios produzidos sob

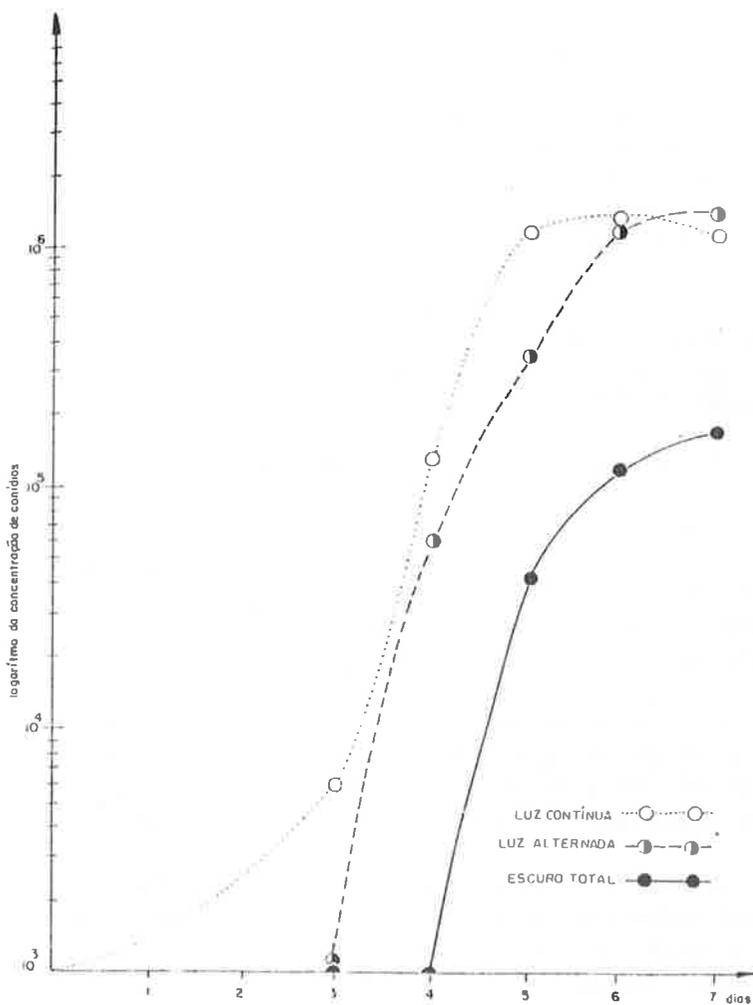


FIGURA 2 - Curvas da produção de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* submetida a diferentes intensidades de luz.

luz contínua foi superior àquele produzido sob luz alternada e escuro total, sendo essa produção iniciada logo no 3º dia, enquanto que para os outros dois tratamentos foi somente a partir do 4º e 5º dia, respectivamente. Apenas após o 6º dia de contagem é que a produção de conídios sob luz alternada igualou-se à de luz contínua.

A produção de conídios sob escuro total foi bem inferior aos dois tratamentos com luz, além dos conídios só começarem a ser produzidos a partir do 5º dia. Por outro lado, nas placas submetidas a esse tratamento, observou-se uma grande produção de micélio branco e cotonoso, enquanto que nos outros tratamentos não se verificou este fato, indicando que a luz parece ter grande influência na produção de conídios. O mesmo fato já havia sido verificado por CHENG & CHEN (1962), MATTA & OLIVEIRA (1978), COCHRANE (1958) e VEEN (1968).

#### D. Germinação em diferentes meios de cultura

Como pode-se verificar na figura 3, o meio de arroz foi o melhor substrato para ocorrer a germinação mais rápida dos esporos da linhagem A de *M. anisopliae*, verificando-se uma alta porcentagem de germinação já a partir da 3ª hora após a inoculação.

Os meios de batata e completo tiveram efeito semelhante na germinação dos conídios, verificando-se a partir da 10ª hora após a inoculação, porcentagens bem próximas daquelas apresentadas no meio de arroz.

A superioridade do meio de arroz em relação ao de batata dextrose e o de amido foi comprovada por AQUINO (1974) na frutificação e desenvolvimento do fungo num menor espaço de tempo. MARQUES & VILAS BOAS (1973) já haviam verificado o bom crescimento e esporulação do fungo nesse meio e outros autores como VILLACORTA (1977) e COSTA & MAGALHÃES (1974) utilizaram esse meio para o cultivo do fungo com êxito. Entretanto, esses resultados referem-se mais ao crescimento e esporulação obtidos sempre em 15 dias de

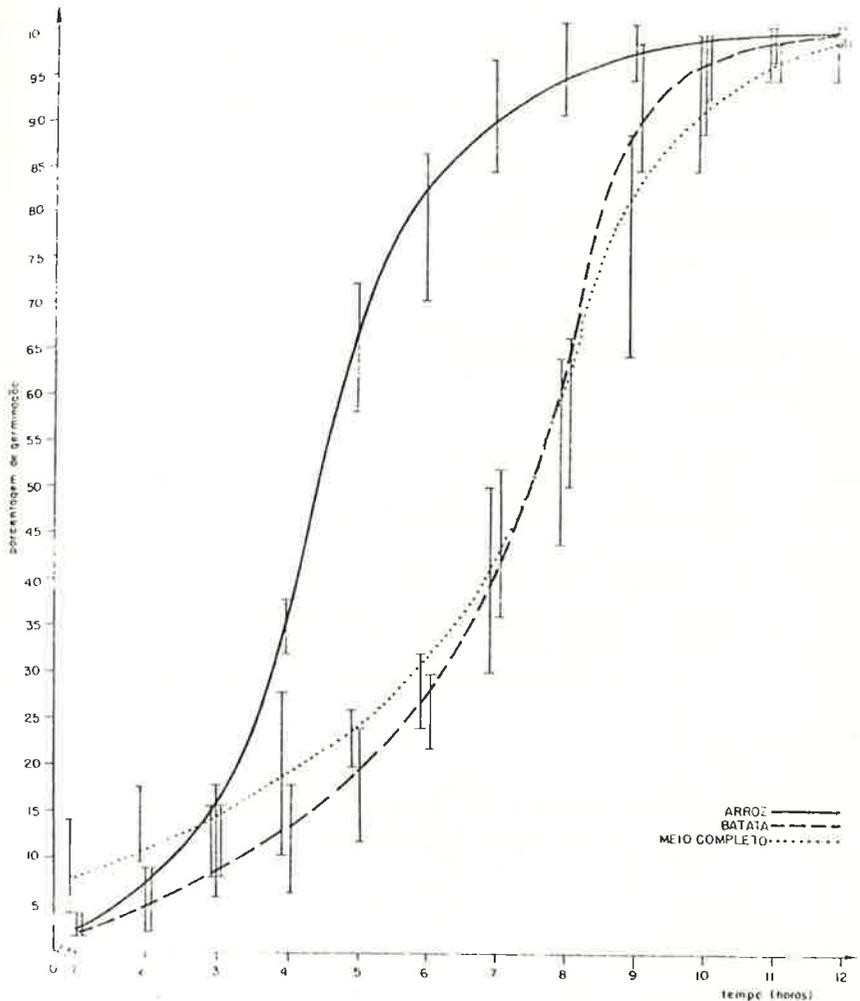


FIGURA 3 - Curvas da germinação de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* nos meios completo, de batata e de arroz líquidos.

cultivo, não havendo informações sobre a relação germinação/tempo.

Os dados sobre o tempo de germinação de *M. anisopliae* poderão ter aplicação nos estudos genéticos onde se visa a obtenção de mutantes através de mutagênicos químicos, os quais poderão ser usados entre 6 e 12 horas após a inoculação do fungo, quando se terá certeza de que o DNA já sofreu pelo menos uma replicação.

### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podem-se tirar as seguintes conclusões, pelo menos na linhagem utilizada:

- A - a temperatura de 37°C inibe o crescimento do fungo, tornando os conídios inviáveis após 96 horas de incubação;
- B - a luz contínua aumenta a esporulação de *M. anisopliae*, enquanto o escuto total favorece o desenvolvimento micelial do mesmo, mantendo-se a luz alternada intermediária aos outros dois tratamentos;
- C - a germinação dos conídios de *M. anisopliae* é mais rápida em meio de arroz do que em meio completo ou meio de batata.

### RESUMO

O presente trabalho foi realizado para verificar os efeitos de temperatura e intensidade de luz no crescimento

to e produção de conídios de uma linhagem do fungo entomopatogênico, *Metarhizium anisopliae*, que vem sendo usada no Brasil para o controle biológico de cigarrinhas. Estudou-se também a influência de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento do fungo. Verificou-se que a temperatura de 37°C inibe a germinação dos conídios da linhagem usada, tornando-os inviáveis se forem expostos por mais de 96 horas nesta temperatura. A luz contínua tem influência sobre a produção de conídios aumentando-a bastante em relação à luz alternada e ao escuro total, sendo que este último favorece o desenvolvimento micelial. Foi verificada a porcentagem de germinação em alguns meios de cultura líquidos, observando-se que o meio de arroz propiciou uma germinação mais rápida.

## SUMMARY

This work was done to determine the effects of temperature and light intensity on the growth and production of conidia by an entomopathogenic strain of *Metarhizium anisopliae* used in the grasshopper biological control in Brazil. The influence of different culture media on fungus growth was also studied. The results showed that there was no conidium germination at 37°C. After 96 hours at this temperature the conidia became inviable. Continuous visible light increased conidium production but mycelial growth was favoured in total darkness. The liquid rice broth was the most objective for a faster conidium germination.

## LITERATURA CITADA

- AQUINO, M.L.M., 1974. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Bol. Tec. Inst. Pesq. Agr.**, Recife, **72**: 1-26.

- BALFOUR-BROWNE, F.L., 1960. The green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in eritrea. *Proc. Soc. Royal Entomol. Soc.*, London, Sér. A., 35: 65-74.
- CHENG, W.Y. & C.B. CHEN, 1962. Preliminary studies on green muscardine fungus. *Rep. Taiwan Sugar Sta.* 29: 72-73.
- COCHRANE, V.W., 1958. *Physiology of fungi*, New York, John Wiley and Sons, Inc., 524p.
- COSTA, M.D.M. & C.D. MAGALHÃES, 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomôgeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin parasita da cigarrinha das pastagens. *B. Inst. Biol. Bahia* 13: 57-60.
- DIOMANDE, T., 1969. Contribution to the study of the development of the green muscardine fungus *Metarrhizium anisopliae* on *O. monaceros* larvae. *Inst. Bull. Fondam Afrique Noire*, Sér. A, 31: 1381-1405.
- GUAGLIUMI, P., 1971. Lucha integrada contra las cigarrinhas (Homopt. Cercopidae) en el noroeste del Brasil. *Rev. Per. Ent.* 14: 361-368.
- GUAGLIUMI, P., 1972. Resultados preliminares da luta biológica contra a "cigarrinha-da-folha" e da cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco. *Brasil Açucareiro* 80: 49-51.
- MARQUES, E.J. & A.M. VILAS BOAS, 1973. Contribuição ao estudo da cultura e aplicações de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) no controle da cigarrinha - de - folha (*Mahanarva posticata* Stal) no nordeste do Brasil. *An. 1ª Rev. Anual Soc. Ent. do Brasil*, Viçosa, MG, p.70.
- MASERA, E., 1957. *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, a parasita del baco da seta. *Ann. Sperim. Agr.* 11: 281-295.

- MATTA, E.A.F. da & M.Z.A. de OLIVEIRA, 1978. Efeito da luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. "in vitro". Res. III Congr. Latinoamer. e V Congr. Bras. Ent., Bahia, p.75.
- MÜLLER-KÖGLER, E.A., 1967. Nebenwirkungen insektenpathogener Pilze auf Mensch und Wirbeltiere: aktuelle Frangen. *Entomophaga* 12: 429-441.
- PIMENTEL GOMES, F., 1963. *Curso de Estatística Experimental*, 2ª ed., Piracicaba, ESALQ/USP, 384p.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MacDONALD & A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Apergillus nidulans*. *Adv. in Gen.* 5: 141-238.
- VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez de criquet pèlerin. *Mendeligen Landbouwhogeschool Wageningen*, Nederland, 68: 1-77.
- VILLACORTA, A., 1977. Technique for the mass culture of the entomophagous fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in granular form. *An. Soc. Entomol. Brasil* 5: 101-104.