

NOVOS TESTES DE CULTIVO DE FUNGOS UTILIZADOS EM CONTROLE BIOLÓGICO USANDO MEIOS DE CULTURA NATURAIS LÍQUIDOS

Ana R. M. Alvarenga*, B. P. Bastos Cruz**, D. A. Oliveira***,
A. P. Silveira****, E. A. Bulisani*****

RESUMO

O estudo foi realizado com o objetivo de comparar o desenvolvimento e a esporulação dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Hansfordia pulvinata* (Berk & Curt.) Hughes, em meios de cultura obtidos por maceração de sementes de três variedades de feijão de mesa (Carioca, Carioca 80 e Jalo) e de feijão Guandú, soja e grão de bico. Os substratos foram obtidos usando 50 g de matéria prima para 500ml de água destilada. A esterilização foi feita em autoclave por 30 minutos.

Foi constatado que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* alcançaram maiores índices de esporulação que *H. pulvinata* em Guandú e grão de bico. Carioca 80 ofereceu boa produtividade de conídios para os três fungos. Jalo teve destaque somente para *H. pulvinata*.

PALAVRAS-CHAVE — *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; *Hansfordia pulvinata*; meios de cultura; feijão; feijão guandú; soja; grão de bico.

SUMMARY

New tests of production of fungi used in biological control through of natural liquids culture media

The study was done in order to compare the development and spores production of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Hansfordia pulvinata* ((Berk. & Curt.) Hughes), in culture media obtained by macerated grains of 3 kinds of table bean (Carioca, Carioca 80, Jalo), Guandú bean, soybean and chick-pea. The substrates were obtained through the use of 50g of grains for 500ml of destilated water. The sterilization was done in autoclave by 30 minutes.

It was evidenced that the fungus *M. anisopliae* and *B. bassiana* reached higher index of sporulation than *H. pulvinata* in Guandú bean and chick-pea. Carioca 80 also offered excelent spore productivity for the 3 fungus. Jalo had eminence only for *H. pulvinata*.

KEY-WORDS — *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; *Hansfordia pulvinata*; culture media; bean, guandú bean; soybean; chik-pea.

INTRODUÇÃO — O uso de fungos entomo e micopatogênicos, no controle biológico de pragas e doenças das plantas econômicas, vêm aumentando significativamente nos últimos anos (1,4,5,8,11,12), face aos problemas inerentes ao uso de defensivos químicos, principalmente sob o ponto de vista de resíduos e de desequilíbrio biológico.

No entanto, para que tais agentes possam ser utilizados, em larga escala, é necessário que se tenha alta produção desses microrganismos. Em virtude desse fato, justifica-se o interesse pelos estudos que buscam encontrar meios

de cultura que viabilizem esse objetivo. Tais meios de cultura, para serem adequados, devem ser de baixo custo, de fácil preparo e eficientes quanto ao desenvolvimento e esporulação de microrganismos de interesse objetivo. Além disso, procuram-se também, tipos de formulações que tornem mais prática a utilização desses inseticidas/fungicidas biológicos no campo.

Diversos pesquisadores tem desenvolvido estudos relativos ao preparo dos mais variados meios de cultura, sendo bastante enfatizados, ultimamente, aqueles que tem características naturais e que possam ser obtidos com facilidade e a

* Bióloga, Seção de Controle Biológico das Pragas, Instituto Biológico, Estagiária Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

** Engº Agrº, Pesquisador Científico, Seção de Controle Biológico das Pragas, Instituto Biológico.

*** Engº Agrº, Pesquisador Científico, Seção de Bioestatística, Instituto Biológico.

**** Engº Agrº, Pesquisador Científico, Seção Estação Experimental de Campinas, Instituto Biológico.

***** Engº Agrº, Pesquisador Científico, Seção de Legumionas, Instituto Agrônomo.

preços reduzidos. Nesses estudos, duas linhas básicas tem sido adotadas com sucesso, quais sejam, usando meios de culturas sólidos (2, 3, 7, 10, 11) ou meios de cultura líquidos, obtidos por maceração de grãos (6, 9, 10).

No presente trabalho, procurou-se dar continuidade à linha de pesquisa estabelecida na Seção de Controle Biológico das Pragas—SCBP, com vistas ao estudo de meios de cultura naturais líquidos, que favoreçam a esporulação dos fungos entomopatogênicos: *Metarhizium anisopliae* [(Metsch.) Sorokin] e *Beauveria bassiana* [(Bals.) Vuill]. Complementarmente, foi também verificada a eficácia desses mesmos meios para o desenvolvimento e produção de esporos do fungo micopatogênico *Hansfordia pulvinata* [(Berk. e Curt.) Hughes].

MATERIAL E MÉTODOS — O estudo foi realizado observando-se o desenvolvimento e a esporulação dos fungos em seis meios de cultura líquidos (macerados de grãos), obtidos a partir de sementes de três variedades de feijão de mesa (Carioca, Carioca 80 e Jalo) e feijão Guandú (Kaqui), soja (IAC-8) e grão de bico (Comercial). Os meios de cultura foram obtidos a partir do cozimento de 50 gramas das sementes em 500ml de água destilada, sob pressão, por 20 minutos. Após o cozimento, as sementes foram amassadas e passadas em peneira comum de cozinha, recolhendo-se o resíduo. Esse resíduo foi juntado à água de fervura, sendo o volume completado para 500ml pela adição de água destilada. Os caldos foram distribuídos em frascos de vidro, com volume de 50ml; tamponados com algodão. Cada frasco continha 10ml de macerado. Os frascos foram então autoclavados por 40 minutos, a 120°C.

Nos meios de cultura assim preparados foram estudados os seguintes fungos:

I — *Metarhizium anisopliae*: cultura n.º 24 da micoteca da SCBP, isolada de “bicudo do algodoeiro” (*Anthonomus grandis* Boheman 1843), recebida do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros” (ESALQ/USP) — referência SPL-358;

II — *Beauveria bassiana*: cultura n.º 23 da micoteca da SCBP, isolada de “bicudo do algodoeiro”;

III — *Hansfordia pulvinata*: cultura n.º 65 da micoteca da SCBP, isolada de frutificações de *Mecrocyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, recebida

do Centro Nacional de Pesquisa da Seringueira e Dendê (EMBRAPA).

A execução do estudo foi feita em 3 etapas, ou seja, com um fungo por vez. Cada etapa foi precedida pelo preparo das matrizes fornecedoras de inóculo e que eram constituídas por culturas em meio de arroz úmido autoclavado. A idade das matrizes esteve sempre ao redor de 15 dias. A operação de repicagem dos fungos foi uniformizada e consistia na introdução de um grão de arroz recoberto de esporos e micélio, no meio de cultura de cada frasco. Foram considerados 7 frascos (repetições) por meio de cultura, para cada microrganismo. Após as inoculações, os frascos eram levados a uma sala de incubação e crescimento, cuja temperatura ambiente permanecia ao redor de 28°C, com umidade relativa do ar próxima de 65% e luminosidade de 8 horas contínuas/dia. Decorrido o tempo necessário para que os fungos colonizassem o meio de cultura e evidenciassem aparente paralização do processo de esporulação, os frascos eram colocados em geladeira a 3°C, no aguardo da leitura para avaliar os totais de conídios formados. A concentração de esporos foi calculada utilizando-se uma Câmara de Neubauer, observando-se ao microscópio com aumento de 400x. Para o preparo das suspensões, submetidas à contagem do número de esporos, foram procedidas diluições de acordo com o seguinte critério: aos frascos originais de cultura foram adicionados 10ml de água destilada estéril, fazendo-se, a seguir, uma agitação intensa por 2 minutos, seguindo-se sua colocação em um agitador orbital durante o período de 2 horas. De cada frasco então foram retiradas 5 amostras de 1ml, às quais foram incorporados 5ml de água destilada. Essas 5 diluições eram agitadas manualmente por 1 minuto e a seguir passadas para a Câmara de Neubauer.

As datas das operações realizadas no estudo dos três fungos foram as seguintes:

Microorganismo	Inoculação	Final do Crescimento	Leitura da Esporulação
<i>M. anisopliae</i>	30/10/86	14/11/86	17 a 20/11/86
<i>B. bassiana</i>	02/12/86	17/12/86	17 a 21/12/86
<i>H. pulvinata</i>	20/03/87	21/04/87	21 a 23/04/87

Para efeito da análise da variância conjunta, os dados referentes ao número de conídios foram transformados em $\sqrt{x}$, aplicando-se o teste

de Tukey para os contrastes de médias, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade. O valor de x foi obtido por média de 60 observações, compostas por 5 lâminas observadas em dois níveis e em cinco campos por nível.

RESULTADOS — A análise estatística conjunta dos três ensaios acusou coeficiente de variação de 13,3%, o que demonstra boa precisão técnica na condução dos experimentos.

TABELA 1 — Resumo da análise de variância conjunta realizada com vistas ao estudo da esporulação dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *H. pulvinata*, em 6 meios de cultura naturais líquidos.

F.V.	G.L.	F
Total	125	
Tratamentos	17	67,18*
Meios de cultura	5	4,03*
Fungos	2	0,30 n.s.
Meios de cultura x Fungos	10	37,11*
resíduo	108	
$X = 4,5$	$s = 0,6$	C.V. 13,3%

Verificou-se através da significância da interação dos meios de cultura/fungos, a necessidade de se avaliar o comportamento de cada fungo dentro de cada variedade de feijão e vice-versa.

Esta avaliação é apresentada na tabela 2, sendo que os contrastes de médias, pelo teste de Tukey, basearam-se nas seguintes diferenças mínimas significativas: fungos dentro dos meios: 0,3; meios dentro de fungos: 0,5.

DISCUSSÃO — Será examinado, inicialmente, o comportamento dos fungos entomopatogênicos. A análise estatística mostrou, para *M. anisopliae*, que o meio de cultura de macerado de guandú foi melhor que os de grão de bico e de carioca 80. Estes, por sua vez, apresentaram respostas semelhantes e superiores aos dos 3 demais, os piores, que não se diferenciaram entre si. Em relação a *B. bassiana*, a análise acusou maiores variações, sendo o meio guandú superior, estatisticamente, ao de grão de bico e, este, ao de Carioca 80. Carioca, Jalo e Soja continuaram formando um grupo homogêneo e inferior. Para *H. pulvinata*, a análise estatística acusou a presença de três grupos de reação, quais sejam: Carioca 80, Jalo e Guandú, os melhores, seguindo-se, em posição intermediária e isolado o Carioca, e ficando por último, grão de bico e soja.

TABELA 2 — Número médio de comídios dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *H. pulvinata* nos meios de cultura líquidos naturais à base de feijão de mesa (Carioca, carioca 80 e jalo), soja, grão de bico e guandú.

Meios de cultura	Fungos		
	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>H. pulvinata</i>
Grão de Bico	6,8 b C	5,2 c B	3,0 a A
Carioca	2,7 a A	3,2 a B	4,0 b C
Jalo	2,7 a A	3,1 a B	5,3 c C
Carioca 80	6,3 b C	4,4 b A	5,4 c B
Guandú	7,8 c B	8,1 d B	5,2 c A
Soja	3,0 a A	3,0 a A	2,7 a A

* As letras maiúsculas referem-se a contrastes de fungos dentro de meios; as letras minúsculas ao contraste de meios dentro de fungos. Letras iguais, dentro de fungos ou de meios, significam médias semelhantes.

TABELA 3 — Valores da esporulação média por ml obtida para os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *H. pulvinata*, em testes de crescimento em meios de cultura líquidos à base de feijões de mesa (Carioca 80, carioca e jalo), soja, guandú e grão de bico.

Microrganismos	Meios de Cultura					
	Carioca 80	Carioca	Jalo	Soja	Guandú	Grão de Bico
<i>M. anisopliae</i>	0,7x10 ⁹	0,2x10 ⁹	0,1x10 ⁹	0,2x10 ⁹	1,5x10 ⁹	1,1x10 ⁹
<i>B. bassiana</i>	0,5x10 ⁹	0,2x10 ⁹	0,2x10 ⁹	0,2x10 ⁹	1,8x10 ⁹	0,7x10 ⁹
<i>H. pulvinata</i>	0,7x10 ⁹	0,4x10 ⁹	0,7x10 ⁹	0,2x10 ⁹	0,7x10 ⁹	0,3x10 ⁹

De outra parte, quando se examinam os efeitos considerando cada tipo de substrato em relação aos microrganismos, chama a atenção o fato de que para os dois fungos entomopatogênicos, os substratos de grão de bico e de Guandú, foram os mais destacados, principalmente o de Guandú. Carioca 80 teve também bom comportamento. Para *H. pulvinata*, onde o grão de bico foi mal e o Guandú muito bem, houve bom comportamento para Carioca 80 e Jalo. Frize-se que este último, mostrou-se fraco com vistas aos dois entomopatogênicos.

No que se refere à produção de conídios, deve ser lembrado que ela esteve sempre na ordem de 10⁹ esporos/ml. As maiores produções estiveram com *B. bassiana* em Guandú (1,8x10⁹) e *M. anisopliae* em Guandú (1,5x10⁹) e grão de bico (1,1x10⁹). Para *H. pulvinata* a esporulação máxima chegou a 0,7x10⁹, inferior, portanto, aos melhores índices dos dois entomopatogênicos.

Deve ser, finalmente, ressaltado, que no presente estudo, foram constatados, respectivamente, para *M. anisopliae* cultivado em macerado de feijão Carioca 80 e de Carioca: 0,7x10⁹ e 0,2x10⁹ esporos/ml. Tais resultados, a despeito de elevados, são inferiores ao observado em pesquisa anterior realizada na Seção de Controle Biológico das Pragas (10), quando foi conseguido 12,5x10¹⁰ esporos/ml, na produção massal do microrganismo em garrafas de 500ml. Em outra ocasião (9), o valor obtido chegou a 6,85x10⁸. Em ambos os casos o feijão utilizado foi Carioca proveniente do comércio local.

Quanto ao fungo *B. bassiana*, cultivado em Carioca 80 e Carioca, que produziu, respectivamente: 0,5x10⁹ e 0,2x10⁹ esporos/ml, tais valores superaram ao constatado em trabalho anterior (6), quando a esporulação em macerado de

feijão Carioca comercial ultrapassou 5x10⁸ conídios/ml.

CONCLUSÕES — As principais conclusões obtidas no estudo foram:

- 1) A esporulação dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *H. pulvinata* nos 6 tipos diferentes de macerado ofereceu consideráveis variações;
- 2) O meio de cultura à base de feijão Guandú foi o único que favoreceu esporulação máxima para os 3 fungos. O feijão Carioca 80 também apresentou bons níveis de produção de conídios para todos os microrganismos;
- 3) Grão de bico caracterizou-se por estimular os 2 agentes entomopatogênicos, enquanto que feijão Jalo só beneficiou o micopatogêno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AQUINO M. L. N., O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Bol. Tec. Inst. Agron.*, Pernambuco, 72: 1-26, 1974.
2. AQUINO, M. L. N.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; SENA, R. C.; QUEIROZ, G. F. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. *Bol. Tec. CODECAP*, Recife, (4): 29p., 1975.
3. AQUINO, M. L. N.; VITAL, A. F.; CAVALCANTI, V. L. & NASCIMENTO, M. G. Cultura de *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin em sacos de polipropileno. *Bol. Tec. CODECAP*, Recife, (3): 7-11, 1974.
4. AZEVEDO, J. L. & MESSIAS, C. L. O papel dos fungos no controle dos insetos. *Supl. Cultural*, O Estado de São Paulo, 3(132), 14-5, 1979.

5. BAIRD, R. B. Use of fungus diseases in biological control of insects. Proc. 10th Intern. Congress Entomology, 4: 689-92, 1958.
6. BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B. P. B., CAMARGO, L. M. P. C. de A., OLIVEIRA, D. A. Crescimento de *Beauveria* sp. isolado de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) em meios de cultura naturais líquidos. *Biológico*, São Paulo, 51: 17-21, 1985.
7. CAMARGO, L. M. P. C. de A. Desenvolvimento do fungo *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin em diferentes meios de cultura naturais sólidos. *Biológico*, São Paulo, 49: 107-9, 1983.
8. CAMARGO, L. M. P. C. de A.; BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B. P. B. Ocorrência do fungo *Beauveria* sp. patogênico ao "bicudo" do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) na região de Campinas, Estado de São Paulo. *Biológico*, São Paulo, 50: 65-8, 1984.
9. CRUZ, B. P. B.; ABREU, O. C.; OLIVEIRA, D. A.; CHIBA, S. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em meios de cultura naturais líquidos. *Biológico*, São Paulo, 49(5): 111-16, 1983.
10. CRUZ, B. P. B.; OLIVEIRA, D. A.; CARDELLI, M. A.; ABREU, O. C. Produção massal de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em meios de cultura naturais de arroz e de maceado de feijão. *Biológico*, São Paulo, 51: 169-74, 1985.
11. JUNQUEIRA, N. T. V.; SILVA, S. E. L.; SILVA, H. M.; SILVA, M. A. M. Controle biológico do "mal das folhas" da seringueira por *Hansfordia pulvinata*. *Rel. An. CNPQD/EMBRAPA*, Manaus, (40), 1986. 5p.
12. ROBBS, C. F. Combate biológico por intermédio de microrganismos. In: Simpósio Brasileiro sobre Combate Biológico, 1., Rio de Janeiro, 1962. *Bol. Inst. Ecol. Exp. Agric.*, 21: 41-6, 1962.

Recebido para publicação em 03/09/1988.