

Produção de conídios dos fungos *Beauveria bassiana* LCB289 e *Metarhizium anisopliae* LCB255 em diferentes condições nutricionais

Alícia Vieira de Sá¹; Jamille Cardeal da Silva¹; Beatriz Aguiar Jordão Paranhos²; Carlos Alberto Tuão Gava³

Resumo

A produção bioinseticidas em grande escala é onerosa e há uma busca constante de estratégias de redução de custos e seleção de estirpes menos exigentes. *Beauveria bassiana* LCB289 e *Metarhizium anisopliae* LCB255 são isolados oriundos do Semiárido brasileiro e são pouco conhecidas quanto às condições que influenciam na produção de conídios. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de conídios destes fungos em condições de diferentes concentrações de fontes de carbono e nitrogênio em meio sintético. Os estudos foram realizados em meio de cultura contendo concentrações crescentes de dextrose e extrato de levedura, avaliando-se a produção de conídios por área de superfície. *M. anisopliae* LCB255 produziu o maior número de conídios nas concentrações de 37,5 g L⁻¹ e 3,24 g L⁻¹ de dextrose e extrato de levedura, respectivamente, com produção de 1,8 x 10⁷ conídios cm⁻². *B. bassiana* LCB289 obteve maior produção nas concentrações de 57,2 g L⁻¹ e 7,08 g L⁻¹ de dextrose e extrato de levedura, respectivamente, produzindo 2,35 x 10⁸ conídios cm⁻². Mesmo considerando o aumento da concentração de nutrientes, a produtividade obtida pelo isolado LCB289 o torna um agente de controle com menor custo efetivo de produção.

Palavras-chave: controle biológico, produtividade de conídios, condições nutricionais.

¹Estudante de Ciências Biológicas, UPE, estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carlos.gava@embrapa.br.

Introdução

Nos últimos anos, o uso de bioinseticidas no controle de pragas vem sendo cada vez mais comum no Submédio do Vale do São Francisco, principalmente porque sua aplicação reduz os riscos de contaminação do ambiente e dos alimentos. Os fungos *B. bassiana* e o *M. anisopliae* são considerados os agentes fúngicos como maior aplicação no controle microbiano de insetos. Contudo, há uma grande variabilidade quanto às condições de cultivo para a produção economicamente eficaz de propágulos infectivos destes fungos, principalmente no que concerne às exigências nutricionais (Verhaar; Hijwegen, 1993).

O método de multiplicação de fungos entomopatogênicos mais utilizado no Brasil foi detalhadamente descrito pelos pesquisadores do Instituto Biológico de Campinas e da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (Alves et al., 2008). Contudo, a definição de quantidades e fontes de carbono (C) e nitrogênio (N), e o equilíbrio entre estes nutrientes continuam sendo objeto de pesquisa.

B. bassiana LCB289 e *M. anisopliae* LCB255 foram previamente selecionados pela virulência a pupas e adultos de *Ceratitis captata* (Santos et al., 2016). No entanto, pouco se sabe quanto à sua produtividade e exigências nutricionais para a produção de propágulos infectivos.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de conídios dos isolados de fungos entomopatogênicos em meio sintético utilizando-se diferentes concentrações de carbono e nitrogênio.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Foram utilizados os fungos *B. bassiana* LCB289, isolado a partir de um adulto de *Rhynchophorus palmarum* morto, coletado em área com plantio de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) da Embrapa Produtos e Mercados, Petrolina, PE; enquanto *M. anisopliae* LCB255 foi isolado a partir de larvas mortas de *Spodoptera frugiperda* em plantio de milho (*Zea mays* L.), na área experimental da Embrapa Semiárido. Os isolados foram mantidos na coleção do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido.

Uma suspensão de conídios foi preparada pela raspagem de placas densamente inoculadas e filtradas em camada dupla de gaze esterilizada e padronizada em 10^5 conídios mL⁻¹. Cem microlitros da suspensão de cada uma

dos isolados foi inoculada em placas de Petri com meio salino básico (BSM) (K_2HPO_4 2,5 g L⁻¹, $MgSO_4$ 0,12 g L⁻¹, $FeSO_4$ 0,20 g L⁻¹) e adicionados de concentrações crescentes de dextrose anidra, como fonte de carbono, e extrato de levedura, como fonte de nitrogênio.

Os meios de cultivos foram definidos variando-se a concentrações dos dois nutrientes, de forma a obter diferentes relações C:N, entre 5 e 200:1, com diferentes massas dos nutrientes. As placas foram incubadas a 27 °C, em câmara de incubação com foto período de 14:10 horas claro/escuro pelo período de 12 dias.

Após o período de incubação, o diâmetro das colônias foi medido tomando-se duas medias em linhas perpendiculares entre si que cortavam o eixo da colônia utilizando-se um paquímetro. Para a determinação da produção de conídios, foi tomada uma amostra padronizada cortando-se um disco de 0,5 cm de meio de cultura a partir do centro das colônias. Os discos foram transferidos para microtubos contendo 1 mL de Triton X-100 a 0,01% (Sigma Ltd, Dortmund-GE), seguindo-se de agitação em vórtex por 30 segundos.

A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se diluição seriada 1:10 da suspensão até a diluição necessária para a contagem de 10 a 50 conídios por observação. As contagens foram procedidas por duas vezes em cada tubo e obtidas as médias das duas contagens, quando não foram discrepantes entre si. Havendo grandes diferenças entre as contagens, o processo foi repetido. A partir dos valores das contagens de cada repetição e do diâmetro das colônias, calculou-se a produção média dos conídios por área (cm²) de superfície de meio de cultivo.

A viabilidade dos conídios foi avaliada depositando-se gotas de suspensões, obtidas como descrito acima, na superfície de meio de cultivo BDA e contagem de conídios com tubos germinativos com comprimento superior ao diâmetro do conídio 24 horas após a inoculação.

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial com delineamento inteiramente casualizado, com quatro doses de C (20,0 g L⁻¹; 40,0 g L⁻¹; 60,0 g L⁻¹ e 80,0 g L⁻¹ de glucose) e cinco doses de N (1,0 g L⁻¹; 2,0 g L⁻¹; 3,0 g L⁻¹; 4,0 g L⁻¹ e 5,0 g L⁻¹ de extrato de levedura), conduzido em triplicada. Após a análise de variância, os dados de produção de conídios foram submetidos à regressão não linear utilizando-se o software Statistica for Windows v. 12 (IBM). Os modelos gerados foram utilizados para a determinação da melhor concentração de nutrientes a partir da derivada de segunda ordem da equação para cada um dos nutrientes.

Resultados e Discursão

As duas espécies diferiram entre si quanto à exigência nutricional para a produção de conídios em meio sintético ($F_{(1;37)} = 7,28$; $p < 0,05$). As equações de regressão não linear obtidas foram: $E_{LCB289} = -7,37 + 43,12G + 3,10YE + 31,37G^2 + 0,13YE^2$ e $E_{LCB255} = 12,46 + 29,81G - 2,41YE - 30,93G^2 + 0,09YE^2$. Na qual E= número de conídios, G = concentração de glucose; YE= concentração de extrato de levedura.

Na Figura 1 observa-se que *M. anisopliae* LCB255 apresentou baixa exigência de dextrose, com concentração ótima para a produção de conídios de $37,5 \text{ g L}^{-1}$ e de $3,24 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, resultando em relação C:N no meio de cultivo de 11,6:1. *B. bassiana* LCB289 apresentou maior exigência tanto na concentração de fonte de carbono quanto de nitrogênio do que *M. anisopliae* LCB255, com produção máxima de conídios, $2,35 \times 10^8$ conídios cm^2 , nas concentrações de $57,2 \text{ g L}^{-1}$ e $7,08 \text{ g L}^{-1}$ de dextrose e extrato de levedura, respectivamente, resultando em relação C:N 8,1:1.

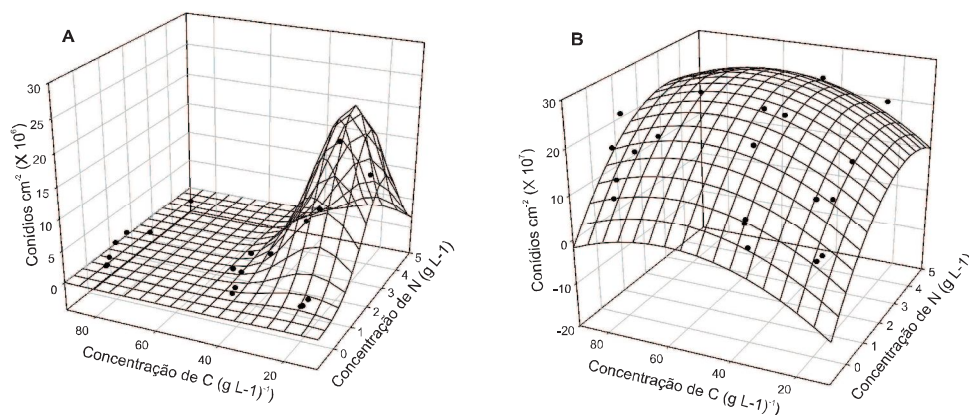


Figura 1. Número de conídios produzidos *Metarhizium anisopliae* LCB255 (A) e *Beauveria bassiana* LCB289 (B) (conídios cm^{-2}) em meio de cultivo com diferentes concentrações de dextrose (fonte de C) e extrato de levedura (N), resultando em diferentes relações C:N.

A variação na concentração dos dois nutrientes permitiu a determinação do efeito da concentração de cada nutriente e da relação C:N ótimas para a produção de conídios. A otimização do processo de produção de propágulos infectivos de agentes microbianos para o controle de pragas e doenças é uma etapa importante do desenvolvimento de um produto. Em estudo similar, Safavi et al. (2007) demonstraram que a fonte de nutrientes e a relação C:N do meio de cultivo pode afetar significativamente a produção e a qualidade dos conídios.

Os isolados LCB255 e LC289 são pouco conhecidos quanto à especificidade de hospedeiro e às exigências nutricionais. Neste estudo, verificou-se que *B. bassiana* LCB289 apresentou exigência maior quanto à concentração de nutrientes e menor relação C:N do meio de cultivo para a máxima produção de conídios. No entanto, apresentou produção dez vezes maior do que *M. anisopliae* LCB255. Assim, embora a menor exigência do LCB255 permita o uso de meios de menor custo, o aumento de dez vezes na produtividade de LCB289, apenas dobrando-se a concentração de nutrientes, o torna um melhor candidato a agente de controle biológico de pragas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à viabilidade dos conídios, com taxa de germinação em torno de 95-97%. Nos próximos estudos, se buscará conhecer o efeito da disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo sobre a virulência destes isolados contra as mosca-das-frutas.

Conclusão

A concentração ótima de dextrose e extrato de levedura para *M. anisopliae* LCB255 foi de 37,5 g L⁻¹ e 3,24 g L⁻¹, respectivamente. Para *B. bassiana* LCB289, a maior produção de conídios foi obtida com concentrações de 57,2 g L⁻¹ de dextrose e 7,08 g L⁻¹ de extrato de levedura. A produção de 2,35 x 10⁸ conídios cm⁻² por LCB289 o torna um agente de controle com o menor custo efetivo de produção.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Semiárido pela oportunidade de estágio e ao técnico de laboratório da Embrapa Semiárido, Herbert M. Targino, pelo apoio dado na realização dos estudos.

Referências

- ALVES, S.; LEITE, L.; FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.; LOPES, R. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 215-234.
- SAFAVI, S. A.; SHAH, F. A.; PAKDEL, A. K.; REZA RASOULIAN, G.; BANDANI, A. R.; BUTT, T. M. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 1, p. 116-123, 2007.

SANTOS, I. L. A.; BARBOSA, T. de F. G.; GAVA, C. A. T.; SIMÕES, W. L.; PARANHOS, B. A. J. Emergência de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) após a aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* Sorokin no solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 26.; CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 9., 2016, Maceió. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2016. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/151537/1/pARANHOS.pdf>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

VERHAAR, M. A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialocanidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 101-103, 1993.