

MEIOS DE CULTURA E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS EM  
*Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin\*

Silvia Maria Frigo\*\*  
João Lúcio de Azevedo\*\*

RESUMO

Foi estudada a produção de conídios em meio completo e em meio contendo diferentes concentrações de farinha de arroz, no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. As linhagens mais produtivas em meio completo foram M, E<sub>6</sub>, A<sub>4</sub> e E<sub>9</sub>; em meio de arroz, verificou-se que maior produção ocorria quando o arroz era adicionado na concentração de 60 g/l.

INTRODUÇÃO

A superioridade do meio de arroz, em relação ao de amido e batata - dextrose no desenvolvimento e esporula-

\* Entregue para publicação em 30/04/86.

\*\* Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* já foi comprovada por MARQUES & VILAS BOAS (1973), AQUINO (1974) e VALE *et alii* (1980). MOURA-COSTA & MAGALHÃES (1974) e VILACORTA (1978) utilizaram esse meio de cultivo para produção de conídios de *Metarhizium anisopliae*. Esse fungo é utilizado no controle biológico de cigarrinha da cana-de-açúcar e de pastagens em substituição aos inseticidas químicos. Para tal, há necessidade de produção em larga escala de conídios o que é feito em meio de arroz, especialmente arroz autoclavado em sacos de polipropileno ou frascos de vidro. MOURA-COSTA & MAGALHÃES (1974), utilizaram também a farinha de arroz, obtida com auxílio de um moinho e posteriormente passada em peneira de malhas finas, verificando bom crescimento e esporulação em meio com concentração de 5% de farinha de arroz, 1% de ágar em pó e água destilada. DAoust & ROBERTS (1983) utilizando seis diferentes tipos de meios micológicos e três tipos de arroz concluíram que para produção de conídios o meio de arroz foi o que produziu resultados melhores e mais econômicos mesmo comparado aos meios micológicos complexos.

O presente trabalho foi conduzido, visando estudar a conidiação de linhagens de *Metarhizium anisopliae* em relação a sua variabilidade natural para produção de conídios em meio com diferentes concentrações de farinha de arroz e em comparação com um meio complexo, denominado de completo e utilizado largamente em laboratórios de Genética de fungos filamentosos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Linhagens e Meios de Cultura

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* utilizadas foram:

Linhasgens	Local de isolamento	Hospedeiro original
A <sub>4</sub>	Salvador (BA)	<i>Mahanarva posticata</i>
C	Recife (PE)	<i>M. posticata</i>
E <sub>9</sub>	Vitória (ES)	<i>Deois flavopicta</i>
K	Jahú (SP)	<i>D. flavopicta</i>
M	Manaus (AM)	<i>Deois</i> sp
PE(PL <sub>5</sub> )	Pernambuco	<i>M. posticata</i>

Como meio de cultura utilizou-se o meio completo (MC) descrito por PONTECORVO *et alii* (1953) modificado por AZEVEDO & COSTA (1973) e meio de arroz (MA) modificado a partir do meio proposto por AQUINO (1974). As linhagens vieram dos estoques do Departamento de Genética da ESALQ e eram mantidas em MC inclinado.

#### Produção de Conídios em Meio Completo e Meio de Arroz

Conídios das linhagens A<sub>4</sub>, C, E<sub>9</sub>, K, M e PE de *M. anisopliae* foram inoculadas isoladamente em quatro pontos equidistantes de placas de Petri, contendo meios com concentração crescente de farinha de arroz (15, 30, 45, 60, 75 e 90 g/l) e também em meio completo. Após 10 dias de incubação, através de um cilindro metálico ôco, de 7 mm de diâmetro foram retiradas amostras da região central de três colônias de cada linhagem. Para contagem dos conídios, colocaram-se essas amostras em 2,5 ml de solução aquosa de tween 80 (0,1% v/v) e, após forte agitação determinou-se o número de conídios em câmara de Neubauer. O número de conídios por área de crescimento foi determinado calculando-se a superfície das amostras circulares através da fórmula:  $\pi R^2$  onde:  $\pi$  = constante e R = raio da amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se observa na Tabela 1, existe uma concentração ótima de arroz para cada linhagem; em geral, essa concentração situa-se ao redor de 60 g/l.

Tabela 1. Produção de conídios ( $N \times 10^5/cm/ml$ ) das seis linhagens de *Metarhizium anisopliae* no 10º dia de crescimento em meio de arroz com concentrações crescentes de farinha de arroz e em meio completo (MC).

Arroz g/l	Linhagens					
	A <sub>4</sub>	C	E <sub>9</sub>	K	M	PE
0 (MC)	65,12	10,26	45,06	20,30	248,19	50,00
15	00,00	0,10	17,70	00,00	9,70	8,30
30	11,10	8,33	88,40	20,13	159,47	26,37
45	22,87	21,17	258,27	28,43	159,10	230,53
60	59,97	51,36	197,60	43,67	256,20	280,80
75	57,93	40,90	187,90	50,97	141,10	101,10
90	27,03	10,07	230,57	57,56	118,23	172,63

Em termos de produção relativa, o número de conídios formados por  $cm^2$  após o 10º dia de crescimento, foi maior nas linhagens PE, M e E<sub>9</sub>.

Estes resultados sugerem que meios muito ricos ou muito pobres, acarretam diminuição na produção enquanto que meios intermediários promovem um aumento de produção. Nota-se que as linhagens ensaiadas, aumentaram de 1 a 5 vezes a esporulação em meio de arroz, em relação ao MC.

Torna-se evidente (Figura 1) que o MC não favoreceu a produção de conídios com exceção da linhagem A4, em quanto que meio de arroz em uma concentração média de 60 g/l propiciou a melhor conidiação da maioria delas. A linhagem A4 é dentre as linhagens de *M. anisopliae* estudada das por vários autores (VALLE, 1985; LUNA, 1985) a mais atípica o que levou a sua classificação como uma outra variedade ou mesmo uma nova espécie dentro do gênero *Metarhizium* (LUNA, 1985).

BASTOS et alii (1976) utilizaram farinha de milho, farinha de arroz, de trigo e mistura desse amiláceos e verificaram que a esporulação foi sempre melhor nos meios em que a farinha de trigo entrou na composição. Dessa maneira, uma sugestão seria em se introduzir farinha de trigo juntamente com a concentração ideal de arroz para a produção de conídios. Os dados obtidos no presente trabalho são de importância na obtenção de conídios em laboratórios, quando se quer obter quantidade razoável dos mesmos para estudos genéticos. Uma vez que as linhagens utilizadas foram mantidas em meio artificial por muitos anos em laboratórios e submetidas a repiques sucessivos o número de conídios obtidos não pode ser comparado ao de outros trabalhos, especialmente os que visam produção industrial dos mesmos. MURAYAMA et alii (1981) já demonstrou, por exemplo, que após vários repiques a produção de conídios do fungo decaiu. Entretanto, ficou mais uma vez demonstrada a alta variabilidade genética que ocorre na espécie em questão.

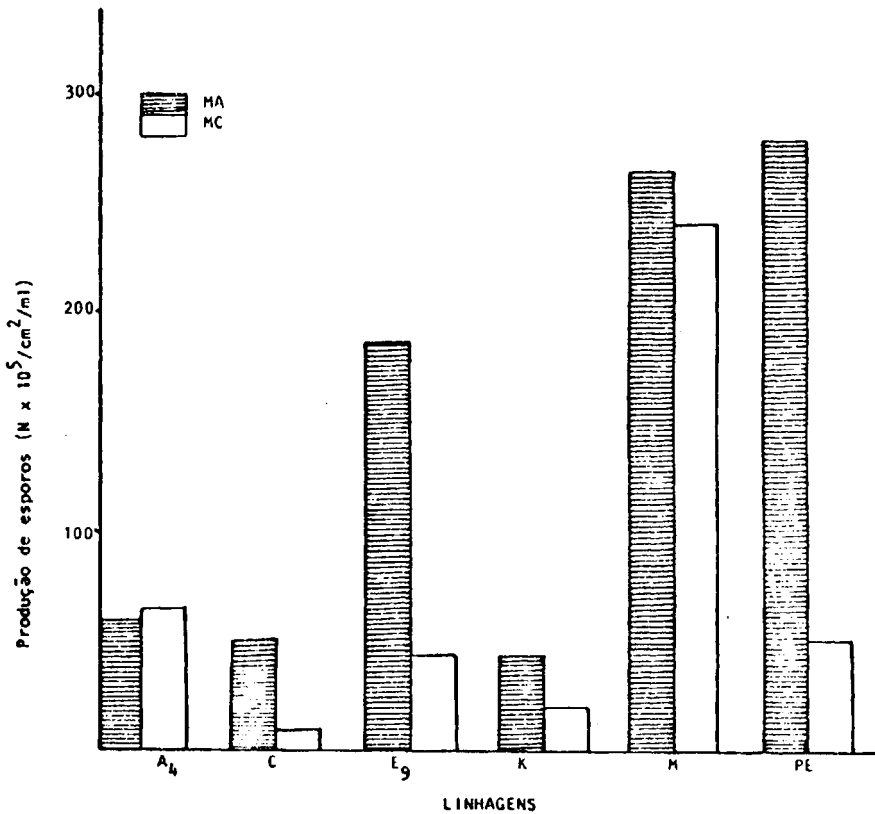


Figura 1. Comparação da produção de esporos em meio completo e em meio de arroz (60 g/l) no 10º dia de desenvolvimento em seis isolados de *Metarhizium anisopliae*. (MA = Meio de arroz; MC=Meio completo).

## CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- Para cada linhagem de *M. anisopliae* existe uma concentração ótima de arroz para produção de conídios, o que demonstra a variabilidade genética, existente dentro do gênero. A concentração ótima está entretanto, ao redor de 60 g/l.

- Meios muito ricos ou pobres, condicionam uma produção de conídios menor que nos meios intermediários.

## SUMMARY

CULTURE MEDIA AND CONIDIATION IN *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.

It was determined the production of *Metarhizium anisopliae* conidia in Petri dishes containing both complete medium and media with different rice concentrations. The more productive isolates were M, P and Eg and it was noted that in rice medium high conidia production were obtained with 60 g of rice per liter.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas, 72:1-26. Recife.

- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. da, 1973. **Exercícios práticos de Genética**, Cia Editora Nacional e Editora da USP, 288 p
- BASTOS, C.N.; MATTA, E.A.F. & FIGUEIREDO, J.M., 1976. Es-  
população de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) sorokin,  
em meios de cultura de diferentes composições. Boletim do Instituto Biológico da Bahia. 15:9-11.
- DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W., 1983. Studies on the  
prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia:  
Effect of growth substrate on conidial survival and  
virulence against mosquitoes. **Journal Invertebrate  
Pathology** 41:161-170.
- LUNA, E.A., 1985. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 260 p.
- MARQUES, E.J. & VILLAS BOAS, A.M., 1973. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata* Stal) no Nordeste do Brasil. Anais da 1.<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Entomológica do Brasil, Viçosa, MG. p.70.
- MOURA COSTA, M.D. & MAGALHÃES, C.D., 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, parasito da "cigarrinha" das pastagens. Boletim do Instituto Biológico da Bahia, 13:57-60.
- MURAYAMA, M.T.; ALVES, S.B. & ALMEIDA, L.C., 1981. Effects of serial transfers in a rice medium in the pathogenicity morphology and spore production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Entomology Newsletter** 11:16.



- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, 5:141-238.
- VALE, T.L.; FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C. L., 1980. Variabilidade em linhagens haplóides e diplóides de *Metarhizium anisopliae*. **Resumos do VII Congresso Brasileiro de Entomologia**, Campinas, p.347.
- VILACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. **Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia**, Bahia, p.70.