

EFEITO DA TEMPERATURA E DA LUMINOSIDADE NO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO *SPOROTHRIX INSECTORUM* (HOOG & EVANS)*

E. de S. Loureiro, A. Batista Filho*, J.E.M. de Almeida, L.G. Leite, C. Lamas

Centro Experimental Central, Instituto Biológico, CP 70, CEP 13001-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: loureiro@fca.unesp.br

RESUMO

O trabalho teve o objetivo de determinar a temperatura e o fotoperíodo adequados para obter-se o melhor desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Sporothrix insectorum* para o aperfeiçoamento do seu sistema de produção. Esse fungo vem sendo utilizado no controle microbiano do percevejo-de-renda da seringueira *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Tingidae). Para determinação dos fatores abióticos, foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental Central do Instituto Biológico, localizado em Campinas, SP. Os tratamentos foram quatro temperaturas (22, 25, 28 e 31°C) e três regimes de luz (24, 12 horas de luz, e 24 horas de escuro) onde avaliou-se o crescimento vegetativo e reprodutivo, produção e viabilidade de *S. insectorum*. Os parâmetros utilizados na avaliação foram: diâmetro da colônia, concentração e viabilidade de conídios. Verificou-se que a produção de conídios foi significativamente maior a 28°C, enquanto que a temperatura de 31°C limitou o crescimento de micélio e reduziu drasticamente a viabilidade dos conídios. Foi observado que na ausência total de luz a esporulação foi afetada quando comparada ao regime de luz contínua. A utilização alternada de luz e escuro mostrou-se adequada à produção de *S. insectorum*.

PALAVRAS-CHAVE: Seringueira, *Sporothrix insectorum*, *Leptopharsa heveae*, produção, fotoperíodo, controle biológico.

ABSTRACT

EFFECT OF THE TEMPERATURE AND LIGHT REGIME ON THE DEVELOPMENT OF *SPOROTHRIX INSECTORUM*. The fungus *Sporothrix insectorum* has been used in Brazil for the control of the lace bug *Leptopharsa heveae* in rubber plantations. *L. heveae* was first found in São Paulo State in 1995 and since then, its population has grown progressively reaching levels which of recent causes economic damage to the rubber crop. This research was conducted in the laboratory of biological control, at the Centro Experimental Central do Instituto Biológico to access a system that allows the maximization of the fungus production. Four temperatures (22, 25, 28 and 31°C) and 3 light regimes (24 and 12 hours of lightness, and 24 hours of darkness) were investigated with respect to the growth, production and viability of *S. insectorum*. Colony diameter, concentration and viability of conidia were the parameters considered regarded for the evaluation. The growth and viability of the fungus were highly affected at 31°C, however there was no statistical difference among the other temperature regimes. Conidia production was higher at 28°C. There was no statistical difference among the light patterns, although the conidia production dropped when the pathogen was kept under 24 hours of darkness.

KEY WORDS: *Sporothrix insectorum*, *Leptopharsa heveae*, entomopathogenic fungi, production, rubber tree.

INTRODUÇÃO

O Estado de São Paulo vem se destacando como o principal produtor de látex, sendo a região de São José de Rio Preto um importante polo heveícola. A cultura é explorada por cerca de 2500 produtores, a maioria

dos quais é formada por um grande número de pequenos e médios proprietários.

Esse crescimento também foi acompanhado pelo aumento dos problemas fitossanitários como o percevejo-de-renda da seringueira *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Tingidae) (DRAKE & POOR, 1935). Recente-

* Pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

mente o aparecimento foi assinalado por BATISTA FILHO *et al.* (1995) em Buritama, SP.

O hábito de *L. heveae*, tanto das ninfas como de adultos, é de permanecer na face ventral das folhas de seringueiras jovens e adultas, sugando a seiva e destruindo o parênquima foliar, dificultando com isto, a função fotossintética da planta e produzindo lesões que predispõem ao ataque de microorganismos (CARRERA, 1973 citado por MOREIRA, 1985).

O fungo entomopatogênico *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans) possui grande potencial de utilização no controle de percevejo-de-renda. Esse microrganismo foi constatado pela primeira vez infectando este inseto em Manaus, AM, causando alto nível de mortalidade na população do referido inseto (CELESTINO FILHO & MAGALHÃES, 1986).

JUNQUEIRA *et al.* (1987) recomendaram o controle do percevejo-de-renda da seringueira com a aplicação do fungo *S. insectorum* logo após a troca das folhas que acontece nos meses de agosto e setembro e uma segunda aplicação, em novembro ou dezembro do mesmo ano.

Os fungos Hyphomycetes possuem as características desejáveis para um patógeno ser efetivo como produto comercial, fato este que tem despertado grande interesse no seu estudo (ALVES, 1998). O conhecimento dos fatores abióticos é fundamental para maximizar a produção e, conseqüentemente, viabilizar o fornecimento do bioinseticida para uso em larga escala.

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes para o desenvolvimento do ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos (IGNOFFO *et al.*, 1976; SOSA GOMEZ, 1990). Muitos estudos têm demonstrado que os conídios podem germinar sob uma ampla faixa de temperatura (COLE & HOCH, 1991). Segundo FERRON (1978), a temperatura afeta o crescimento do micélio, enquanto outros autores relatam que a germinação dos conídios também é afetada (YENDOL, 1968; ALVES & NOGUEIRA, 1984).

Outro fator importante é o fotoperíodo. Segundo COCHRANE (1958), a luz visível e a radiação próxima ao ultravioleta podem interferir em três aspectos na esporulação: efeitos indutivos, ou seja, um aumento no número de estruturas reprodutivas sob a ação da luz, inibição do crescimento e resposta neutra. GOTTLIEB (1950) observou que freqüentemente a radiação altera o comportamento dos fungos, algumas vezes promovendo inibição da germinação e, mais raramente, estimulando esse processo. Estes resultados estão diretamente relacionados com o tempo de exposição e a intensidade luminosa e, na maioria das vezes, a germinação é inibida quando o comprimento de onda decresce através das regiões do espectro de luz visível.

Este trabalho teve o objetivo avaliar o efeito da temperatura e regime de luz adequados para produção de *S. insectorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental Central do Instituto Biológico, sendo utilizado o isolado CB 88 do fungo *Sporothrix insectorum*, pertencente ao Banco de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu" do mesmo Laboratório, localizado em Campinas, SP.

Experimento nº 1: Determinação da temperatura adequada ao desenvolvimento do fungo

Foram considerados quatro tratamentos, representados por quatro temperaturas (22, 25, 28 e 31°C). Para cada tratamento foram feitas 9 repetições, sendo cada repetição formada por uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar acrescido de antibiótico tetraciclina 0,1%). No centro de cada placa foram inoculados conídios de *S. insectorum*. As placas foram mantidas em câmara de germinação, com 12 horas de luz, nas diferentes temperaturas.

Após quatro dias de incubação, foi avaliado o crescimento da colônia através da medição do diâmetro. Em seguida, retirou-se de cada placa, com o auxílio de um anel metálico esterilizado, uma amostra (1,1mm) da colônia pesando 0,5g. Esse material foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril e submetido à vigorosa agitação em agitador de tubos, para promover a desagregação dos conídios.

A partir dessas suspensões inoculou-se, através de uma pipeta de Pasteur, três gotas em placas de Petri contendo BDA. A suspensão foi espalhada com alça de Drigalsky. Foram inoculadas 9 placas para cada tratamento e incubadas por 17 horas sob temperatura de 26°C. Após esse período foi determinada a viabilidade dos conídios através da contagem sob microscópio ótico, dos propágulos germinados e não germinados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey (P<0,05) para comparação entre as médias.

Experimento nº 2: Determinação da quantidade de luz adequada ao desenvolvimento do fungo

O experimento consistiu de três tratamentos, formados por diferentes regimes de luz quais sejam: desenvolvimento do fungo em regime de luz contínua; de total escuridão e de luz alternada (12 horas de luz e 12 horas de escuro). A fonte de luz era proveniente de três lâmpadas fluorescentes, luz do dia, 20 W, instalada no interior de uma câmara de germinação com temperatura regulada para 26°C.

A metodologia de avaliação e o delineamento experimental utilizados neste experimento foram

idênticos aos descritos no experimento anterior, exceto pelo número de repetições que, nesse caso, foram de oito placas para cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento nº 1: Determinação da temperatura adequada ao desenvolvimento do fungo

O crescimento vegetativo do fungo *S. insectorum*, promovido pelas temperaturas de 22, 25 e 28°C, foi semelhante. Essas temperaturas proporcionaram maior desenvolvimento do fungo quando comparadas ao fungo mantido à temperatura de 31°C (Tabela 1). Esses dados confirmam os resultados obtidos por TANZINI (1999), que observou redução de 81% no crescimento colonial do fungo *S. insectorum* quando exposto a 30 e 34°C, em comparação ao fungo mantido nas temperaturas de 22 e 26°C.

Com relação à viabilidade dos conídios, também não ocorreu diferença estatística entre as temperaturas de 22, 25 e 28°C, enquanto que sob temperatura de 31°C a viabilidade foi drasticamente reduzida para 10,29% (Tabela 1). Quanto à produção de conídios ficou evidente a superioridade obtida na temperatura de 28°C, diferindo de todos os demais tratamentos. Nesse caso, as temperaturas de 22 e 31°C foram as mais prejudiciais à produção de conídios, com redução de mais de 50% na concentração quando comparado ao tratamento 28°C (Tabela 1).

Portanto, considerando os resultados obtidos para crescimento, concentração e viabilidade, a temperatura de 28°C foi a mais adequada para produção de conídios de *S. insectorum*. Também pode-se afirmar que a temperatura de 25°C foi adequada para o desenvolvimento do entomopatógeno. Assim, a faixa entre 25 e 28°C é favorável à produção do fungo.

Os dados obtidos neste são semelhantes aos apresentados por BERNARDO *et al.* (1998), cujas observações evidenciaram que o crescimento das colônias de *S. insectorum* e *Hirsutella* sp. foi mais intenso na faixa de temperatura de 22 a 26°C. Quanto a conidiogênese, OLIVEIRA (2000) cita que as melhores esporulações de *S. insectorum*, em meios líquidos, são em temperaturas mais altas (28 e 31 °C para meio de extrato de batata e 25 e 28°C para o meio de macerado de guandu). De acordo com MONTEIRO (1988), os melhores valores para o desenvolvimento de diversas espécies de fungos entomopatogênicos situam-se na faixa compreendida entre 20 e 30°C

Uma hipótese que pode explicar as diferenças obtidas no crescimento vegetativo e produção de propágulos por diversos autores é o fato dos isolados de *S. insectorum* serem diferentes, bem como os diferentes componentes presentes em cada meio de cultura utilizado.

Tabela 1 - Diâmetro médio de colônias, concentração e viabilidade dos conídios do fungo *Sporothrix insectorum* em diferentes temperaturas e fotofase de 12 horas, após 4 dias de incubação.

Tratamento (Temperatura)	Diâmetro (cm)	Concentração (10 ⁷ conídios/mL)	Viabilidade (%)
22 °C	1,22 A	1,07 C	88,76 A
25 °C	1,38 A	1,84 B	61,20 A
28 °C	1,38 A	2,42 A	95,51 A
31 °C	0,88 B	0,88 C	10,29 B
CV (%)	15	21	22

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Experimento nº 2: Determinação da quantidade de luz adequada ao desenvolvimento do fungo

O efeito causado pela luz sobre o crescimento e esporulação do fungo *S. insectorum* foi baixo, principalmente no crescimento da colônia, onde as médias dos tratamentos foram semelhantes entre si (Tabela 2). Ocorreu diferença estatística apenas para a produção de conídios quando se comparou os efeitos produzidos pelos regimes de luz contínua (11,78 x 10⁷ conídios/mL) e ausência de luz (6,33 x 10⁷ conídios/mL). OLIVEIRA (2000) estudando iguais regimes de luz para produção de conídios de *S. insectorum*, em meios líquido e sólido, obtivera resultados semelhantes ao presente estudo.

Foi observado que não ocorreu efeito da luz sobre o crescimento vegetativo de *S. insectorum*, independente do regime utilizado. Este resultado indica que a iluminação tem pouca ou nenhuma influência sobre o crescimento do fungo. Entretanto, alguns pesquisadores relatam que a iluminação estimula a produção de conídios (MADELIN, 1968; SANTOS, 1978; TONET & REIS, 1979). Já no que diz respeito ao fungo *Metarhizium anisopliae*, a maior quantidade de esporos foi produzida em regime de iluminação alternada conforme relatos feitos por BASTOS & MATA (1976). Segundo VALLE & AZEVEDO (1985), qualquer regime de luz aumenta a produção de conídios, entretanto para se obter o máximo rendimento é necessário determinar o tipo de luz mais favorável em função de cada patógeno, para cada isolado e também para cada meio de cultura utilizado.

Quanto à viabilidade de *S. insectorum*, a quantidade de luz também não interferiu na germinação dos conídios, independente do tratamento (Tabela 2). Face aos resultados, o regime alternado de luz seria uma alternativa viável tanto técnica como economicamente, haja visto que os dados obtidos nesse tratamento foram semelhantes estatisticamente àqueles com o fungo mantido em regime de luz contínua.

Tabela 2 - Diâmetro médio de colônias, concentração e viabilidade dos conídios do fungo *Sporothrix insectorum*, obtidos sob três condições de luminosidade em temperatura de 26°C, após 4 dias de incubação.

Tratamento (Regime de luz)	Diâmetro (cm)	Concentração (10 ⁷ conídios/mL)	Viabilidade (%)
T _C	2,00 a	11,78 a	93,22 a
T _{12/12}	1,55 a	8,22 ab	89,44 a
T _E	1,89 a	6,33 b	91,66 a
CV (%)	33	35	7

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

T_C = Regime de 24 horas de luz e 24 horas após a inoculação das placas.

T_{12/12} = Regime de 12 horas de luz e 12 horas de ausência de luz e 24 horas após a inoculação das placas.

T_E = Regime de 24 horas de ausência de luz e 24 horas após a inoculação das placas.

CONCLUSÕES

A produção de conídios de *Sporothrix insectorum* foi maior à temperatura de 28°C;

A temperatura de 31°C foi prejudicial ao desenvolvimento do fungo em laboratório;

A ausência total de luz afetou a esporulação do fungo.

A utilização alternada de 12 horas de luz e 12 horas de escuro mostrou-se adequada para a produção de *Sporothrix insectorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. & NOGUEIRA, N.L. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., 1984, Londrina. *Resumos*. p.170.
- ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- BASTOS, C.N. & MATA, E.A.F. Influência das temperaturas e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Bol. Inst. Biol. Bahia*, Salvador, v.15, p.12-13, 1976.
- BATISTA FILHO A.; LEITE, L.G.; SILVEIRA, A.P. Ocorrência da mosca de renda *Leptopharsa heveae*, em Buritama, SP. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 8., 1995, São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.62, p.81, 1995. Suplemento.
- BERNARDO, E.R.A.; RODRIGUES, A.M.; CASSETARI NETO, D. Efeito da temperatura e de produtos químicos sobre o ciclo biológico de *Sporothrix insectorum*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 1998, Rio de Janeiro, RJ. *Resumos*. p.18.

- CELESTINO FILHO, P. & MAGALHÃES, F.B.L. Ocorrência do fungo *Sporothrix insectorum* Hoog & Evans, parasitando a mosca de renda (*Leptopharsa heveae* Drake & Poor) em seringa de cultivo. Manaus: EMBRAPA/CNPDS, 1986. 2p.
- COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York: John Wiley, 1958. 542p.
- COLE, G.T. & HOCH, H.C. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, New York, Plenum Press, 1991. p.72.
- DRAKE, C.J. & POOR, M.E. Na undescribed rubber tingitid from Brazil (Hemiptera). *J. Wash. Acad. Sci.*, v.25, n.6, p.283-284, 1935.
- FERRON, P. Biological control of insects pest by entomogenous fungi. *An. Ver. Entomol.*, Palo Alto, v.23, p. 409-442, 1978.
- GOTTLIEB, D. The physiology of ecore germination in fungi. *Bot. Ver.*, Bronx, v.16, p.229-251, 1950.
- IGNOFFO, C.M., GARCIA, C., HOSTETTER, D.L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi*. *Environ. Entomol.*, v.5, p. 935-936, 1976.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; LIMA, M.I.P.M.; MARTINS, M.A.M.; MAGALHÃES, F.E.L. Isolamento e cultivo do fungo *Sporothrix insectorum* a ser utilizado para o controle da mosca de renda da seringueira. Local: EMBRAPA/CNPDS, 1987. 4p. (Comunicado Técnico, 56).
- MADELIN, M.F. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogenous fungi. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S. (Eds.). *The Fungi*. New York: Academic Press, 1968. v.3, p.227-238.
- MONTEIRO, A.C. Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus). São Carlos, 1988. 233p. [Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos].
- MOREIRA, I.P.S. A *Leptopharsa heveae* (Drake & Poor) e seus danos às mudas de *Hevea brasiliensis* (Muell.). Universidade Federal do Paraná - Curitiba, PR: 1985. 48p. [Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná].
- OLIVEIRA, S.M.C. Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos. Jaboticabal, SP: 2000. 45p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP].
- SANTOS, A.L.L. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba: 1978, 148p. [Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo].
- SOSA GOMEZ, D.R. Caracterização de isolados de *Beauveria* spp. e determinação das exigências térmicas e hídricas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Piracicaba: 1990. 98p. [Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo].
- TANZINI, M.R. Resistência de clones de seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell Arg.) a *Leptopharsa heveae* Drake & Poor, 1935 (Hemiptera: Tingidae) e sua biologia.

- Jaboticabal: 1996. 137p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP].
- TANZINI, M.R. Manejo integrado do percevejo-de-renda da seringueira e ácaros na *Hevea* In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE HEVEICULTURA PAULISTA, 1., 1999, Barretos. *Anais*. Barretos: 1999. p.31-44.
- TONET, G.L. & REIS, E.M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos pragas de soja. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.14, p.89-95, 1979.
- VALLE, T.L.; AZEVEDO, J.L. Influência da qualidade da luz no crescimento radial e esporulação de *Metarhizium anisopliae*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 37., 1985, Belo Horizonte. *Resumos*. Belo Horizonte: 1985. p.731.
- YENDOL, W.G. Factors affecting germination of *Entomophthora conidia*. *J. Invertebr. Pathol.*, v.10, p.116-121, 1968.

Recebido em 26/10/01

Aceito em 14/3/02