

Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais

Izabel Aparecida Soares Jabor, João Alencar Pamphile, Suzymeire Baroni Rodrigues, Giuliani Grazyella Marques-Silva, Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha*

Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. *Metarhizium anisopliae* é o fungo entomopatogênico melhor caracterizado, sendo usado no controle de grande número de insetos-praga, como carrapatos, cigarrinha da cana-de-açúcar e das pastagens. O presente trabalho objetivou analisar seu desenvolvimento vegetativo e esporulação em resposta à composição nutricional do meio de cultura. Para análise do ciclo vegetativo, foram medidos os diâmetros de colônias de cada linhagem em meio completo, meio Saboraud e meio batata-dextrose-agar (PDA) após 15 dias a 28°C. Para avaliação da esporulação, recortes dessas colônias foram transferidos para 0,01% Tween 80 e os esporos foram contados em hematómetro. O crescimento vegetativo foi maior em meio Saboraud e, para a esporulação, três linhagens responderam melhor ao meio completo e três ao PDA. Os presentes resultados indicam que os fatores ambientais interferem de forma particular em cada fase do ciclo de *Metarhizium*, o que justifica maiores estudos sobre os mecanismos genéticos e ambientais que controlam o seu desenvolvimento.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, desenvolvimento vegetativo, esporulação, nutrição.

ABSTRACT. Analysis of nutritional medium composition on development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Metarhizium anisopliae* is the better characterized entomopathogenic fungus. This mold attacks many insects that represent plagues of agriculture. The objective of this work was to analyse its vegetative development and sporulation in different medium composition. The vegetative growth was analysed by average of colony diameter of each strain in 15 days growth at 28°C in complete medium, Saboraud medium and potato-dextrose-agar (PDA). A fragment of each colony was transferred to 0,01% Tween 80 and counted in hemocytometer, to sporulation evaluation. The vegetative growth was better in Saboraud medium. The sporulation was higher in complete medium for three strains and another three responded better to PDA. These results have indicated that the environmental factors interfere, in a particular manner, in each moment of *Metarhizium* cycle. This study justifies more researches about genetic and environmental mechanisms that control development of this fungus.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, vegetative development, sporulation, nutritional factors.

Introdução

Os defensivos agrícolas vêm sendo empregados em escala crescente ano a ano. Embora apresentem alta e rápida eficiência, trazem consigo dois graves aspectos a serem considerados: o custo e o impacto ambiental. Nesse contexto, o controle biológico mostra-se como uma alternativa relevante e viável (Alves, 1998).

Metarhizium anisopliae é o fungo entomopatogênico melhor caracterizado, sendo por esse motivo utilizado no controle de grande número de insetos-praga, entre os quais, a cigarrinha da cana-

de-açúcar, a cigarrinha das pastagens e os carrapatos (Luna, 1985; Thomas *et al.*, 1995; 1999; 2000; Kaaya *et al.*, 1996; Zhioua *et al.*, 1997; Frazzon *et al.*, 2000; Athayde *et al.*, 2001; Gimenez-Pecchi *et al.*, 2002).

Esse microrganismo é um fungo filamentosos, deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales, família Moniliaceae (Tulloch, 1976; Rombach *et al.*, 1987).

Metarhizium apresenta crescimento e esporulação ótimos em temperaturas entre 20°C e 30°C (Vilacorta, 1978). Segundo Alves e Nogueira (1984), em temperaturas abaixo de 16°C e acima de 36°C a germinação dos conídios é nula, havendo perda de

viabilidade após exposição a 40°C por 24 horas. Ferron (1978) mostrou que em temperaturas inferiores há um retardo no desenvolvimento, um aumento na formação de micélio e na redução na formação de conídios.

As características morfológicas e fisiológicas desse fungo apresentam grande variação em diferentes meios de cultura. Em alguns casos, ocorre alteração na coloração dos conídios em resposta à composição do meio (Luna, 1985; Pamphile, 1992). É tolerante a uma faixa de pH de 2,0 a 8,5, sendo 6,9 a melhor condição para o crescimento vegetativo e esporulação (Pamphile, 1992). Com relação à composição nutricional, é um microrganismo pouco exigente, desenvolvendo-se em diversos meios de cultura, utilizando como fonte de carbono: amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (Lihnell, 1944; Huber, 1958). Também apresenta um ótimo desenvolvimento em meio mínimo e meio completo de Pontecorvo *et al.* (1953) para *Aspergillus nidulans* (Messias, 1979).

Para a produção desse fungo com a finalidade de utilização em controle biológico no campo, além da virulência, que é um dos alvos nos projetos de melhoramento genético, outros traços são imprescindíveis, como a resistência a altas temperaturas, baixa umidade e grande incidência de luz ultravioleta, condições comuns no campo, principalmente em países tropicais como o Brasil (Luna, 1985; Thomas e Jenkins, 1997; Milner, 2000).

O crescimento vegetativo que precede e acompanha a etapa de esporulação é uma fase de extrema importância, tanto no laboratório, nos procedimentos de produção dos inóculos, quanto no campo, na capacidade invasiva do inseto. A produção de conídios, da mesma forma, é indispensável, pois sem os esporos não há inóculo e, no campo, o ciclo secundário, ou seja, a produção de conídios após a infecção do inseto garante a manutenção do controle no campo (Luna, 1985). Ambas as fases de desenvolvimento dependem de uma cascata de eventos coordenados temporal e espacialmente por um complexo sistema de regulação da expressão gênica, bastante estudado em outros fungos filamentosos como *Aspergillus nidulans* (Timberlake e Clutterbuck, 1994; Rocha, 1997).

Embora o controle seja genético, o desenvolvimento responde drasticamente a fatores ambientais como luz, temperatura, nutrientes, pH e umidade (Millstein *et al.*, 1983; Glare *et al.*, 1986; Smitley *et al.*, 1986; Hajek *et al.*, 1990; Oduor *et al.*, 1996; Milner *et al.*, 1997; James *et al.*, 1998; Luz e Fargues, 1998; Milner, 2000).

O objetivo do presente trabalho foi analisar o desenvolvimento vegetativo e a esporulação de *M. anisopliae* em resposta à composição nutricional do meio de cultura.

Material e métodos

Linhagens

As linhagens MT6, MT11 e MT14 foram obtidas por tratamento da linhagem MT selvagem, originária de Mato Grosso, com luz ultravioleta (Pamphile, 1992). Da mesma forma, AL *paba pro* é um mutante obtido por Kava-Cordeiro *et al.* (1995) a partir da linhagem AL selvagem, coletada em Alagoas. O diplóide foi obtido também por Pamphile (1992) pelo cruzamento entre as linhagens MT6 e MT14 e a linhagem 25P é um segregante parameiótico espontâneo desse diplóide. Todas as linhagens foram cedidas pelo Dr. Pamphile.

De acordo com a nomenclatura usual, os genótipos e fenótipos dessas linhagens são os seguintes:

MT - selvagem

MT6 - *ylo met lis* - com conídios amarelos e requerimentos para metionina e lisina, respectivamente

MT11 - *nic lis* - com requerimento para ácido nicotínico e lisina

MT14 - *nic tia* - com requerimento para ácido nicotínico e tiamina

AL *paba pro* - com requerimento para ácido p-aminobenzoico e prolina

Diplóide - *ylo+/ylo- met+/met- lis+/lis- nic+/nic-tia+/tia-* - selvagem com conídios verdes heterozigoto para cor de conídios e para os requerimentos metionina, lisina, ácido nicotínico e tiamina.

25P - *ylo met tia-* com conídios amarelos e requerimentos para metionina e tiamina.

Meios de cultura

O meio mínimo (MM) e o meio completo (MC) foram elaborados como o descrito por Pontecorvo *et al.* (1953) e modificado por Rocha (1997). O meio Saboraud (MS) e o meio de batata-dextrose-agar (PDA) foram preparados com pH 6,8.

Análise do ciclo vegetativo

As linhagens foram inoculadas por picada no centro de placas contendo cada um dos meios, em triplicata. Após 15 dias de incubação a 28°C, foi realizada a medição de diâmetro das colônias e calculada a média das 3 avaliações de cada linhagem em cada meio de cultura.

Análise da esporulação

De cada colônia preparada conforme o item anterior, foi recortado um quadrado de 1cm². Esse

pedaço da colônia foi cuidadosamente transferido para um tubo de ensaio contendo 1mL de solução 0,01% Tween 80 e agitado vigorosamente. Uma alíquota foi transferida para uma câmara hematimétrica e os esporos foram contados ao microscópio óptico.

Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta uma estimativa do crescimento vegetativo das colônias das diferentes linhagens em resposta a diferentes composições nutricionais. O meio mais rico é o meio completo MC, pois além da fonte de carbono e sais, é suplementado com vitaminas, extrato de levedura, peptona e aminoácidos. O meio batata-dextrose-agar (PDA) é o mais pobre, mas, além da maior concentração de dextrose do MC (2%), este tem razoável concentração de amido. O meio Saboraud (MS) possui, além de peptona, 4% de sacarose. Como se pode observar, o desenvolvimento vegetativo foi melhor no MS, em todas as linhagens. Esses resultados são surpreendentes se analisados sob o ponto de vista dos suplementos. Na maioria absoluta dos fungos, o crescimento é melhor na proporção do enriquecimento do meio de cultura. No entanto, se analisar a concentração de fonte de carbono, pode-se justificar a resposta de desenvolvimento vegetativo do fungo. De fato, em outros organismos essa relação já foi relatada (Clutterbuck, 1974; Rocha, 1997).

Tabela 1. Avaliação do crescimento vegetativo de *Metarhizium anisopliae* em resposta a diferentes meios pelo diâmetro das colônias crescidas por 15 dias a 28°C. Os valores representam a média das medidas do diâmetro de 3 colônias para cada condição

Linhagem	MC	MS	PDA
MT6	5,2 BCb	6,6 ABCa	3,4 Bc
MT11	6,7 Aa	7,5 Aba	6,4 Aa
MT14	6,1 Abb	7,6 Aba	7,1 Aab
AL <i>paba pro</i>	5,7 Aba	6,2 Bca	6,0 Aa
MT selvagem	6,3 Abb	8,0 Aa	7,4 Aa
Diplóide	6,0 Aba	6,5 Bca	6,2 Aa
25P	4,4 Ca	5,2 Ca	4,5 Ba

MC: Meio Completo; CV: 4,698; MS: Meio Saboraud; PDA: Batata-dextrose-agar; Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

A Tabela 2 apresenta a concentração de esporos por cm² em cada condição. Os resultados foram o inverso dos apresentados na Tabela 1, ou seja, apenas 1 linhagem esporulou melhor em MS. Esses resultados apontam novamente para a fonte de carbono, pois Clutterbuck (1974) e Rocha (1997) apresentam, em *Aspergillus nidulans*, resultados na mesma direção. Nesses trabalhos, há diferença na esporulação mesmo entre 1% e 2% de dextrose.

Tabela 2. Avaliação da esporulação de *Metarhizium anisopliae* em resposta a diferentes meios de cultura pelo número de conídios por cm² das colônias crescidas por 15 dias a 28°C. Os valores representam a média de 3 colônias para cada condição

Linhagens	Número de conídios (x 10 ⁵)/cm ²		
	MC	MS	BDA
MT6	14,6 Ea	8,8 Eb	9,8 Eb
MT11	56 Db	30 Cc	218 Ca
MT14	280 Ab	265 A	346Aa
AL <i>paba pro</i>	180 Ca	100 Bc	108 Db
MT selvagem	256 Bc	260 Ab	275 Ba
Diplóide	10,2 Fb	14,0 Da	11,0 Eb
25P	57,2 Da	1,0 Fb	1,6 Fb

MC: Meio Completo; CV: 34,260; MS: Meio Saboraud; PDA: Batata-dextrose-agar; Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

Diante desses resultados, fica claro que para a produção do fungo para inóculo, o meio que favorece a maior produção micelial seria o MS que, no entanto, não é a melhor condição para a esporulação. Estes dados evidenciam o delicado processo de interação entre os ciclos vegetativo e de esporulação, mostrando que em algumas situações o melhor é optar por uma condição intermediária, como seria o meio PDA, que não oferece o maior crescimento vegetativo (nem o menor), mas, em compensação, resulta em grande quantidade de esporos.

O presente trabalho indica a necessidade de analisar de forma mais profunda essas interações entre ciclos de desenvolvimento, como a questão: será que a escolha das melhores combinações nutricionais para obtenção de maior quantidade de esporos não poderia estar interferindo na viabilidade desses esporos em condições de campo? Uma germinação mais lenta, por exemplo, poderia aniquilar todo o esforço empreendido no melhoramento da virulência de uma linhagem (capacidade de adesão, desenvolvimento do apressório, etc). Considerando que a genética do desenvolvimento do *M. anisopliae* está apenas começando, há, sem dúvida, muitas outras questões a responder para que os problemas de aplicação sejam equacionados.

Referências

- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. ed. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: Manole, 1998. p.21-37.
- ALVES, S. B.; NOGUEIRA. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorokin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina. Resumos. Londrina, p. 170, 1984.
- ATHAYDE, A. C. R. et al. Fungos entomopatogênicos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 21, p. 12-15, 2001.

- CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R. C. (Ed.). *Handbook of Genetics*. New York: Plenum Publishing, cap.26, p.447-510, 1974.
- FERRON, P. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol. Soc.*, Berlin, v. 23, p. 409-42, 1978.
- FRAZZON, A. P. G. et al. In: vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam v. 93, p. 117-125, 2000.
- GIMENEZ-PECCI, M. D. et al. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.*, New York, v. 45, n. 5, p. 334-339, 2002.
- GLARE, T. R. et al. The effect of environmental factors on the production, discharge and germination of primary conidia of *Zoophthora phalloides* Batko. *J. Invertebr. Pathol.*, San Diego v. 48, p. 275-283, 1986.
- HAJEK, A. E. et al. Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga*, a fungal pathogen of *Lymantria dispar*. *Environm. Entomol.*, Lanham, v. 19, p. 85-90, 1990.
- HUBER, J. Untersuchunzen zur physiologie insektentotender pilse. *Arch. Mikrobiol.*, Berlin, v. 29, p.257, 1958.
- JAMES, R. R. et al. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a coccinellid. *Environm. Entomol.*, Lanham, v. 27, p. 1506-1513, 1998.
- KAAYA, G. P. et al. Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomopatogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.*, San Diego, v. 67, p. 15-20, 1996.
- KAVA-CORDEIRO, V. et al. Survival and mutant production induced by mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. *Sci Agric.*, Piracicaba, v. 52, p. 548-554, 1995.
- LIHNELL, D. Gronmykos forsakad na *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Fisiologia Undersokningar over gronmykosens swamps. *Stat. Vaxtskyodsanst. Stockolm Meddel*, Stockolm, v. 43, p. 59-90, 1944.
- LUNA, E. A. *Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. 1985. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.
- LUZ, C.; FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *J. Invert. Pathol.*, San Diego, v. 72, p. 97-103, 1998.
- MESSIAS, C. L. *Parassexualidade em Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. 1979. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1979.
- MILLSTEIN, J. A. et al. Microclimatic moisture and conidial production in *Erynia* sp. - in vivo production rate and duration under constant and fluctuating moisture regimes. *Environm. Entomol.*, Lanham, v. 12, p. 1344-1349, 1983.
- MILNER, R. Locust and Grasshopper Biocontrol Committee Newsletter. Issue 2. Camberra: CSIRO, 2000.
- MILNER, R. J. et al. The effect of humidity on germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.*, San Diego, v.69, n. 1, p. 64-9, 1997.
- ODUOR, G. I. et al. Production and germination of primary conidia of *Neozygites floridiana* under constant temperatures, humidities and photoperiods. *J. Invert. Pathol.*, San Diego, v. 68, p. 213-222, 1996.
- PAMPHILE, J. A. *Estudos Genéticos no fungo entomopatogênico Metarhizium anisopliae var anisopliae* (Metsch.) Sorokin. 1992. Tese (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
- PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, San Diego, v. 5, p.141-238, 1953.
- ROCHA, C. L. M. S. *Caracterização Citológica, Genética e Molecular de Um Mutante para Conidiogênese em Aspergillus nidulans*. 1997. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- ROMBACH, M. C. et al. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, v. 88, p. 451-459, 1987.
- SMITLEY, D. R. et al. Environmental effects on production of primary and secondary conidia, infection and pathogenesis of *Neozygites floridana*, a pathogen of the 2-spotted spider-mite *Tetranychus urticae*. *J. Invert. Pathol.*, San Diego, v. 47, p. 325-332, 1986.
- THOMAS, M. B.; JENKINS, N. E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Mycol. Res.*, New York, v. 101, p. 1469-1474, 1997.
- THOMAS, M. B. et al. The year of the locust. *Prest. Outlook*, New York, v. 11, p. 192-195, 2000.
- THOMAS, M. B. et al. Biological control of locusts and grasshoppers using a fungal pathogen: The importance of secondary cycling. *Proc. R. Soc. Lond.*, London, v. 259, p.265-270, 1995.
- THOMAS, M. B. et al. Application of insect pathogen models to biological control. In: HAWKINS, B. A.; CORNELL, H. V. (ed.). *Theoretical Approaches to Biological Control* Cambridge Univ. Press, Cambridge. Pp. 368-384, 1999.
- TIMBERLAKE, W. E.; CLUTTERBUCK, A. J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S. D.; KINGHORN, J. R. (Ed.). *Aspergillus: 50 years on*. New York: Elsevier, 1994. p. 383-27.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Oxford, v. 66, p. 407-11, 1976.
- VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4, Bahia. Resumos. pp.70, 1978.

ZHIOUA, E. *et al.* Pathogenity of the entomopathogenic fungus *Metahizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acaris:Ixodidae). *J. Parasitol.*, Lawrence, v. 83, n. 5, p. 815-818, 1997.

Received on November 13, 2002.

Accepted on July 15, 2003.