

Caracterização morfofisiológica de fungos entomopatogênicos

Morphophysiological characterization of entomopathogenic fungi

Mateus Alves **SALDANHA**^{1,2}; Ervandil Corrêa **COSTA**¹; Marlove Fátima Brião **MUNIZ**¹; Aleksandra Cezimbra **QUEVEDO**¹ & Janaina Silva **SARZI**¹

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae*, em diferentes meios de cultura. Para tanto, foram utilizados quatro isolados de fungos entomopatogênicos e avaliados o crescimento micelial, a esporulação, a coloração e a caracterização dimensional dos conídios em quatro meios de cultura. O isolado de *B. bassiana* apresentou maior crescimento micelial e esporulação no meio V8CaCO₃; o micélio aéreo apresentou-se de cor branca em todos os meios. O isolado de *C. fumosorosea* obteve maior crescimento micelial no meio de cultura completo e maior esporulação no meio batata-dextrose-ágar (BDA); o micélio aéreo variou de vermelho-claro a branco. Em relação aos isolados de *M. anisopliae*, o maior crescimento micelial ocorreu no meio V8CaCO₃, e as maiores produções de esporos, no meio de cultura BDA e completo; a coloração do micélio aéreo variou entre branco e tons de amarelo e verde. Os maiores valores de índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foram observados quando utilizado o meio V8CaCO₃, e os menores, o meio ágar-água. Verifica-se que os meios de cultura influenciam nas características morfofisiológicas dos isolados de fungos entomopatogênicos. Considerando a viabilidade econômica, o meio de cultura BDA é o mais recomendado para a produção massal de fungos entomopatogênicos.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*; controle biológico; *Cordyceps fumosorosea*; *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

The objective of the present work was to carry out the morphophysiological characterization of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* isolates in different culture media. Therefore, four isolates of entomopathogenic fungi were used and the mycelial growth, sporulation, color and dimensional characterization of conidia were evaluated in four culture media. The *B. bassiana* isolate showed greater mycelial growth and sporulation in V8CaCO₃ medium; aerial mycelium was white in all media. The isolate of *C. fumosorosea* showed greater mycelial growth in the complete culture medium and greater sporulation in PDA medium; aerial mycelium ranged from light red to white. Regarding *M. anisopliae* isolates, the greatest mycelial growth occurred in V8CaCO₃ medium and the highest spore production in PDA and complete culture medium; the aerial mycelium color varied between white and shades of yellow and green. The highest values of IVCM were observed when the medium V8CaCO₃ was used, and the lowest, the agar-water medium. It is verified that the culture media influence the morphophysiological characteristics of the entomopathogenic fungi isolates. Considering its economic viability, the PDA culture medium is the most recommended for mass production of entomopathogenic fungi.

Keywords: *Beauveria bassiana*; biological control; *Cordyceps fumosorosea*; *Metarhizium anisopliae*.

Recebido em: 1.º set. 2021
Aceito em: 21 out. 2021

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais, Departamento de Defesa Fitossanitária, Av. Roraima, n.º 1.000, Cidade Universitária, Bairro Camobi – CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil.

² Autor para correspondência: mtsmateusalves@gmail.com.

INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro está em constante mudança no que diz respeito ao manejo adequado de florestas. Nas últimas décadas, é notável a sua importância econômica para o país. No Brasil, as florestas plantadas ocupam 7,83 milhões de hectares e são responsáveis por mais de 90% de toda a madeira empregada para fins produtivos (IBÁ, 2019). O plantio de florestas contribui para a recuperação de áreas degradadas, a regulação dos recursos hídricos, a geração de energia renovável e a conservação da biodiversidade.

Com o constante aumento de áreas com plantios homogêneos que se utilizam de espécies exóticas de rápido crescimento, houve também um acréscimo significativo de problemas fitossanitários, especialmente relacionados a insetos-praga. Como método de controle, tem-se feito uso de produtos químicos (ORTIZ *et al.*, 2017), porém tal alternativa vem apresentando grandes problemas, em virtude da contaminação ambiental, baixa especificidade, possibilidade de ressurgência da praga, seleção de insetos resistentes e dos riscos potenciais à saúde humana e animal (BARBOSA *et al.*, 2015).

Dessa maneira, tem-se observado expressivo crescimento no incentivo a pesquisas e ao uso de produtos que causem menos impactos ambientais, aumentando o consumo de produtos biológico (FONTES *et al.*, 2020). O controle biológico é definido como a aplicação de técnicas baseadas no controle, utilizando inimigos naturais (ESCOBAR-RAMÍREZ *et al.*, 2019). No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021), o uso de produtos biológicos aumentou mais de 70% no ano de 2018, deixando o país entre os primeiros no uso de controles biológicos do mundo.

Com menor impacto ambiental, o controle biológico visa manter o agroecossistema mais próximo possível de um equilíbrio biológico, em que a densidade populacional da praga se mantém abaixo do nível de dano econômico (ZANUNCIO *et al.*, 2018). Entre os microrganismos que causam doenças aos insetos, os fungos entomopatogênicos são os mais importantes, sendo responsáveis por cerca de 80% das enfermidades e considerados ferramentas importantes no manejo integrado de pragas (MIP) (LOPES *et al.*, 2018; VALADARES-INGLIS *et al.*, 2020). Assim, o controle biológico com entomopatógenos é considerado uma alternativa viável, segura e compatível com o ambiente para o controle de insetos-praga (CHÁVEZ *et al.*, 2016).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Hypocreales: Clavicipitaceae) são espécies importantes de fungos entomopatogênicos no controle de pragas em ambientes florestais, constituindo a base de diversos produtos comerciais. Já o fungo *Cordyceps fumosorosea* (Wize) (Hypocreales: Cordycipitaceae) ainda se apresenta em fase inicial de estudos como estratégia de controle de insetos-praga. Para tanto, são necessárias pesquisas voltadas à caracterização morfofisiológica dessas espécies de fungos entomopatogênicos em diferentes meios de cultura, visto que ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos na área; tais pesquisas são de suma importância, pois, conforme Nozaki *et al.* (2004), alguns meios de cultura são mais favoráveis para crescimento e esporulação do que outros, por apresentarem carboidratos complexos que são adequados para a produção de hifas vegetativas ou esporos. Outro fator relevante são os custos de produção dos meios de cultura, tendo em vista que, ao produzir em larga escala fungos entomopatogênicos para o controle biológico de insetos-praga, deve-se considerar a viabilidade econômica, ou seja, utilizar um meio de cultura de baixo custo e que garanta um bom desenvolvimento das características morfológicas dos isolados.

A produção de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano para determinado inseto-praga (SENE *et al.*, 2010), e o estudo de metodologias de produção é indispensável para tornar o controle biológico de pragas economicamente viável para ser aplicado em grandes áreas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae*, em diferentes meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Dra. Elocy Minussi, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

REPICAGEM DOS ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Utilizaram-se quatro isolados de fungos entomopatogênicos, sendo um de *Beauveria bassiana* (IBCB 632), um de *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) e dois de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348 e IBCB 425), os quais foram obtidos no Instituto Biológico de São Paulo, Coleção de Fungos Entomopatogênicos Oldemar Cardin Abreu.

Para a repicagem dos isolados, foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), em que foi repicada no centro de cada placa uma pequena quantidade de estruturas do fungo. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo BOD a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 horas, durante um período de 7 dias para crescimento e esporulação dos fungos.

Para a caracterização morfofisiológica dos isolados de fungos entomopatogênicos, testaram-se quatro meios de cultura: ágar-água (AA), suco de vegetais (V8CaCO₃ – 200 mL de suco de vegetais; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada), batata-dextrose-ágar (BDA – 39 g de produto comercial e 1.000 mL de água) e meio completo (MC – 0,36 g de KH₂PO₄; 1,05 g de Na₂HPO₄·7H₂O; 0,60 g de MgSO₄·7H₂O; 1,00 g de KCl; 10,00 g de glucose; 1,58 g de NaNO₃; 5,00 g de extrato de levedura; 20,00 g de ágar e 1.000 mL de água destilada) (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Decorridos os sete dias de crescimento micelial nas placas de Petri contendo os isolados, foram preparadas suspensões de esporos. Para isso, adicionaram-se 10 mL de água destilada estéril na placa de Petri e, com o auxílio de alça de Drigalski, realizou-se a raspagem do micélio fúngico na superfície do meio, sendo a suspensão filtrada em uma dupla camada de gaze para um béquer e adicionado espalhante adesivo a 0,01% (Tween 40) para fazer a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Após a contagem de esporos, a suspensão foi calibrada para uma concentração de 1×10^6 esporos por mL.

Com o auxílio de um pipetador, transferiu-se uma gota de 10 μL da suspensão de esporos para o centro de cada placa de Petri, contendo os meios de cultura descritos anteriormente. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmaras do tipo BOD em regime de temperatura e luz controladas ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas).

AValiação DO CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DOS ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

A avaliação do crescimento micelial constituiu na medição, a cada 24 horas, do diâmetro da colônia em sentidos diametralmente opostos, com auxílio de paquímetro digital, por um período de 15 dias. Com esses dados, calculou-se o **índice de velocidade de crescimento micelial** (IVCM) para cada isolado em cada meio de cultura, por meio da fórmula de Maguire (1962): $\text{IVCM} = \sum ((D - D_a)/N)$, em que IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de dias após a incubação.

Para a avaliação da esporulação, adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, e em seguida realizou-se a raspagem da colônia com auxílio de alça de Drigalski para que houvesse a liberação dos esporos. A suspensão foi pipetada e filtrada em uma dupla camada de gaze para retenção dos fragmentos miceliais e meio de cultura. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 40 vezes.

CARACTERIZAÇÃO DIMENSIONAL DOS CONÍDIOS E COLORAÇÃO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Para a caracterização dimensional dos conídios, prepararam-se lâminas de microscopia contendo uma pequena quantidade de esporos dos isolados e corante. A largura e o comprimento de 10 conídios por tratamento foram medidos com microscópio óptico, contendo um micrômetro acoplado, em um aumento de 40 vezes. Já a determinação da coloração das colônias foi visual, com auxílio de Carta de Munsell (MUNSELL, 2009), sendo observados a coloração na parte superior e inferior e o aspecto da colônia.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Para os isolados de *Metarhizium anisopliae*, utilizou-se um bifatorial, composto de dois fatores: quatro meios de cultura x dois isolados. Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova), e as médias ao teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Sisvar versão 5.6.86 (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao isolado de *Beauveria bassiana* (IBCB 632), verificou-se que o maior crescimento micelial ocorreu no meio de cultura $V8CaCO_3$ (63,35 mm), seguido dos meios completo (52,02 mm), BDA (46,11 mm) e ágar-água (37,08 mm), havendo diferenças estatísticas no crescimento micelial em relação ao meio de cultura (tabela 1).

Tabela 1 – Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação*.

Meio de cultura	Crescimento micelial (mm)	IVCM (mm/dia)	Esporulação (esporos/mL)
AA	37,08 c	0,58 c	$4,43 \times 10^4$ c
BDA	46,11 b	0,97 b	$3,56 \times 10^6$ b
MC	52,03 b	0,98 b	$3,54 \times 10^6$ b
$V8CaCO_3$	63,35 a	1,09 a	$5,86 \times 10^6$ a
Média geral	49,64	0,91	$3,25 \times 10^6$
CV (%)	6,6	4,98	18,91

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV = coeficiente de variação; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-água; $V8CaCO_3$ = suco de vegetais; MC = meio completo; IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

Ao analisar os valores de IVCM, constatou-se que o maior valor foi encontrado no meio $V8CaCO_3$ (1,09 mm/dia). Não foram observadas diferenças significativas entre os meios BDA e completo, com valores de 0,97 e 0,98 mm/dia, respectivamente. Diferindo estatisticamente dos demais, o menor valor foi verificado no meio ágar-água: 0,58 mm/dia (tabela 1).

Rodrigues *et al.* (2016) observaram, após 10 dias de crescimento em meio de cultura BDA, que *B. bassiana* teve variação de 15,47 mm a 32,96 mm no diâmetro das colônias. Já García *et al.* (2011) verificaram, após 10 dias de incubação em meio de cultura BDA, que o crescimento das colônias de *B. bassiana* foi de 20 mm, afirmando que os isolados apresentaram um crescimento lento e circular. Martins (2014) encontrou, após sete dias de incubação de isolados de *B. bassiana*, diâmetros médios entre 18 e 26 mm. Esses resultados corroboram o presente estudo, visto que, em meio de cultura BDA, a média de crescimento micelial de *B. bassiana* aos dez dias de incubação foi de 30 mm.

Ainda analisando os resultados da tabela 1, averiguou-se que, a respeito da esporulação, o isolado apresentou variabilidade na produção de esporos nos diferentes meios de cultura. O meio V8CaCO₃ obteve maior esporulação ($5,86 \times 10^6$ esporos/mL); não houve diferenças significativas entre os meios BDA e completo, sendo encontrados $3,56 \times 10^6$ e $3,54 \times 10^6$ esporos/mL, respectivamente. No meio de cultura ágar-água, o isolado apresentou o menor valor de esporulação ($4,43 \times 10^4$ esporos/mL), diferindo estatisticamente dos demais meios de cultura testados. Rodrigues *et al.* (2016) observaram que os valores encontrados variaram entre 2.890×10^4 conídios/mL e 13.910×10^4 conídios/mL para isolados de *B. bassiana*. Martins (2014), caracterizando isolados de *B. bassiana*, obteve valores entre 0,2 e $26,2 \times 10^8$ conídios/colônia. Fomentini *et al.* (2015) encontraram valores entre 2,2 e 3,2 cm para o diâmetro da colônia e produção de 0,1 a 13×10^7 conídios/colônia. Observando esses resultados, é possível verificar que há variação na esporulação dos isolados, em que os valores de esporulação foram maiores em relação aos resultados obtidos no presente estudo.

Em relação ao isolado de *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130), constatou-se que o maior crescimento micelial se deu no meio de cultura completo (67,94 mm), seguido do meio V8CaCO₃ e BDA, com médias de crescimento de 67,43 mm e 63,34 mm, respectivamente. Diferindo estatisticamente dos demais, no meio ágar-água ocorreu o menor crescimento micelial, com média de 48,30 mm (tabela 2).

Tabela 2 – Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de *Cordyceps fumosorosea* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação*.

Meio de cultura	Crescimento micelial (mm)	IVCM (mm/dia)	Esporulação (esporos/mL)
AA	48,30 b	0,62 b	$6,14 \times 10^4$ b
BDA	63,34 ab	1,07 a	$8,05 \times 10^6$ a
MC	67,94 a	1,15 a	$2,39 \times 10^6$ ab
V8CaCO ₃	67,34 a	1,21 a	$6,81 \times 10^6$ a
Média geral	61,73	1,01	$4,33 \times 10^6$
CV (%)	14,22	10,53	17,03

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV = coeficiente de variação; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo; IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

O isolado de *C. fumosorosea* apresentou maior IVCM no meio V8CaCO₃ (1,21 mm/dia), porém não diferiu estatisticamente dos meios BDA e completo, com 1,07 e 1,15 mm/dia, respectivamente; já o menor valor foi encontrado no meio ágar-água, com 0,62 mm/dia (tabela 2).

Ainda analisando os resultados da tabela 2, verificou-se que a maior esporulação de *C. fumosorosea* ocorreu no meio BDA ($8,05 \times 10^6$ esporos/mL), seguido pelos meios V8CaCO₃ e completo ($6,81 \times 10^6$ e $2,39 \times 10^6$ esporos/mL, respectivamente). A menor produção de esporos deu-se no meio ágar-água, com $6,14 \times 10^4$ esporos/mL.

Avaliando o crescimento micelial e a esporulação de diferentes espécies de *Cordyceps* em meio de cultura Sabouraud-ágar-peptona (SAB), Lopes *et al.* (2021) encontraram para *C. fumosorosea* (isolado ESALQ 1296), aos 12 dias de incubação, média de crescimento de 44,40 mm e esporulação média de $2,82 \times 10^6$ esporos/mL. Mesmo utilizando o meio de cultura SAB, esse estudo corrobora os resultados do presente trabalho, quando se comparam os valores de média geral de crescimento e esporulação aos 12 dias de incubação (49,38 mm e $3,46 \times 10^6$ esporos/mL).

Em relação aos quatro meios de cultura testados, o diâmetro das colônias de *Metarhizium anisopliae* variou entre 14,73 mm (IBCB 425) e 69,47 mm (IBCB 348), apresentando valor médio de 48,41 mm (tabela 3). Com relação ao isolado IBCB 348, o maior crescimento da colônia ocorreu no meio de cultura V8CaCO₃ (69,47 mm), seguido dos meios BDA (49,00 mm), completo (46,75 mm) e ágar-água (34,91 mm), havendo diferenças estatísticas no crescimento micelial em relação ao meio de cultura. Já para o isolado IBCB 425 não foram encontradas diferenças significativas entre os meios V8CaCO₃ e completo, com 60,11 mm e 59,83 mm, respectivamente; o meio ágar-água apresentou menor média de crescimento micelial (14,73 mm), diferindo estatisticamente dos

demais. Em todos os meios de cultura testados, verificaram-se diferenças significativas em relação ao crescimento micelial entre os isolados (tabela 3).

Tabela 3 – Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação*.

Isolado	AA	BDA	MC	V8CaCO ₃	Média geral	CV (%)
Crescimento micelial (mm)						
IBCB 348	34,91 Ca *	49,00 Bb	46,75 Bb	69,47 Aa	48,41	4,14
IBCB 425	14,73 Cb	52,46 Ba	59,83 Aa	60,11 Ab		
Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia)						
IBCB 348	0,49 Ca	1,01 Aa	0,91 Ba	1,04 Aa	0,76	5,15
IBCB 425	0,21 Cb	0,74 Bb	0,82 Bb	0,90 Ab		
Esporulação (esporos/mL)						
IBCB 348	4,51 x 10 ⁴ Ca	6,82 x 10 ⁶ Aa	2,35 x 10 ⁶ Ba	6,10 x 10 ⁶ Aa	2,72 x 10 ⁶	16,75
IBCB 425	5,96 x 10 ⁴ Ba	1,20 x 10 ⁶ Bb	3,50 x 10 ⁶ Aa	1,71 x 10 ⁶ ABb		

* Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV = coeficiente de variação; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo; IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

Os resultados deste estudo corroboram o trabalho de caracterização morfológica de *M. anisopliae* realizado por Bezerra (2012), que observou, em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, que o tamanho das colônias variou entre 29,66 mm e 51,33 mm de diâmetro, com média de 43,12 mm. Já García *et al.* (2011) verificaram, após 10 dias de crescimento de *M. anisopliae*, diâmetro de 25 mm, apresentando uma coloração que variou do verde-oliva ao verde-escuro. Adicionalmente, Fernandes *et al.* (2010), ao analisar o tamanho das colônias de isolados de *M. anisopliae*, encontraram médias de diâmetros inferiores a 70 mm.

Em relação aos isolados de *M. anisopliae*, verificou-se que o maior IVCM variou entre 0,21 mm/dia (IBCB 425) e 1,04 mm/dia (IBCB 348), com média geral de 0,76 mm/dia (tabela 3). A respeito do isolado IBCB 348, o maior IVCM ocorreu no meio V8CaCO₃ (1,04 mm/dia), não diferindo estatisticamente quando comparado com o meio BDA (1,01 mm/dia). Em contrapartida, o menor valor pode ser observado no meio ágar-água: 0,49 mm/dia.

Da mesma forma que o isolado IBCB 348, o isolado IBCB 425 apresentou maior IVCM no meio V8CaCO₃ (0,90 mm/dia). Não foram encontradas diferenças significativas entre os meios BDA e completo (0,74 e 0,82 mm/dia, respectivamente), e novamente o menor valor de IVCM se deu no meio ágar-água, com 0,21 mm/dia. Em todos os meios de cultura testados, houve diferenças significativas em relação ao valor de IVCM entre os isolados.

Os valores de esporulação de *M. anisopliae* em diferentes meios de cultura variaram entre 4,51 x 10⁴ esporos/mL (IBCB 348) e 6,82 x 10⁶ esporos/mL (IBCB 348), sendo o valor médio de 2,72 x 10⁶ esporos/mL (tabela 3). O isolado IBCB 348 obteve maior esporulação nos meios BDA e V8CaCO₃, com 6,82 x 10⁶ e 6,10 x 10⁶ esporos/mL, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais. A menor esporulação ocorreu no meio ágar-água, com 4,51 x 10⁴ esporos/mL. Com relação ao isolado IBCB 425, a maior esporulação deu-se no meio completo (3,50 x 10⁶ esporos/mL), seguido pelo meio V8CaCO₃ (1,71 x 10⁶ esporos/mL), e a menor produção de esporos, no meio ágar-água (5,96 x 10⁴ esporos/mL), não havendo diferença significativa entre este e o meio BDA (1,20 x 10⁶ esporos/mL).

Analisando os valores de crescimento micelial e esporulação de todos os isolados, verificou-se que, quando submetidos ao meio ágar-água, foram encontrados os menores resultados. Tal fato pode ser justificado pela falta de nutrientes que o meio possui, o que ocasiona menor crescimento e esporulação dos fungos (CANO *et al.*, 2020). Em contrapartida, ao utilizar os demais meios (BDA, completo e V8CaCO₃), obtiveram-se maiores valores de crescimento micelial e esporulação dos isolados. O maior desenvolvimento dos isolados nesses meios de cultura acontece por causa das fontes de carboidratos existentes neles, tendo em vista que esses nutrientes são de suma importância para o crescimento e a esporulação de fungos entomopatogênicos (ABATI, 2015).

Levando em conta que para a produção massal de fungos entomopatogênicos para o controle biológico a esporulação abundante do microrganismo é um fator fundamental para a sua implementação no manejo integrado de pragas, os meios BDA, completo e V8CaCO₃ suprem tal necessidade. Porém, ao considerar os fatores econômicos necessários para a viabilidade da produção de fungos entomopatogênicos em larga escala, verifica-se que o meio de cultura BDA é o mais indicado, em virtude de seu menor custo de produção.

Com relação à caracterização dimensional dos conídios, o isolado de *B. bassiana* apresentou largura e comprimento médio de conídios de 2,7 µm e 3,1 µm, respectivamente. O isolado de *C. fumosorosea* atingiu largura média de 1,9 µm e comprimento médio de 2,1 µm. Para os isolados de *M. anisopliae*, observou-se largura média dos conídios de 2,5 µm e 4,3 µm para os isolados IBCB 348 e IBCB 425, respectivamente, e, em relação ao comprimento, os conídios apresentaram média de 5,6 µm para o isolado IBCB 348 e 4,5 µm para o isolado IBCB 425.

Para o isolado de *B. bassiana*, as colônias apresentaram micélio aéreo de coloração branca em todos os meios de cultura avaliados (figura 1); já a coloração do reverso da placa de Petri obteve variação entre amarelo e marrom. Em relação ao aspecto das colônias, o isolado teve como característica o aspecto aveludado (tabela 4). Corroborando o presente trabalho, Rodrigues et al. (2016) verificaram que as colônias de *B. bassiana* tinham coloração esbranquiçada, com pequenas regiões variando em tonalidade para branco-amareladas.

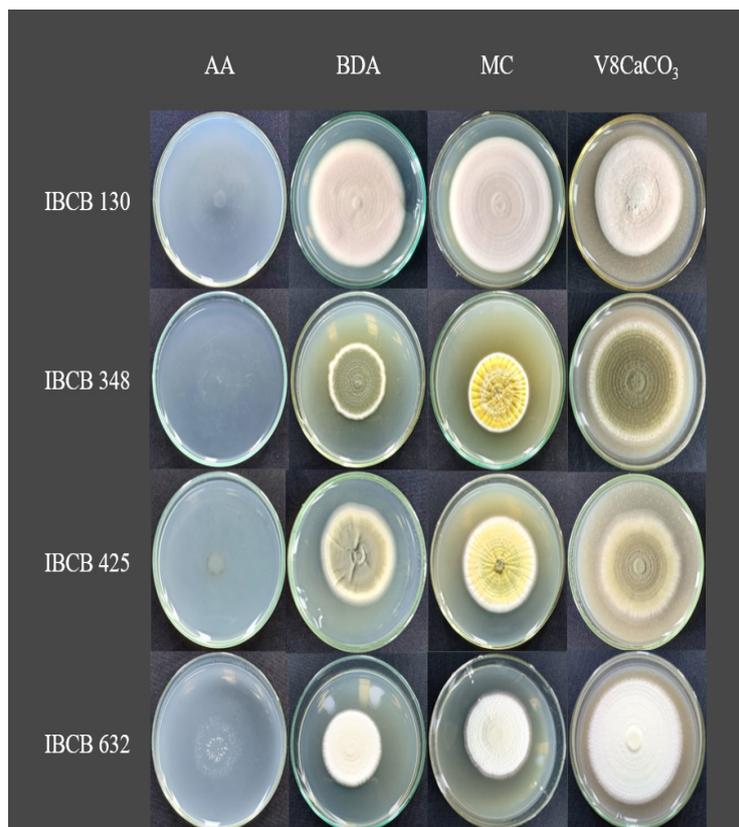


Figura 1 – Aspecto das colônias de isolados de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* em diferentes meios de cultura, após 15 dias de incubação. Legenda: IBCB 130 = isolado de *C. fumosorosea*; IBCB 348 e IBCB 425 = isolados de *M. anisopliae*; IBCB 632 = isolado de *B. bassiana*; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; MC = meio completo; V8CaCO₃ = suco de vegetais. Fonte: Primária.

Tabela 4 – Coloração e aspecto das colônias de *B. bassiana* em diferentes meios de cultura*.

Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
BDA	Branco	Amarelo-claro	Aveludado
V8CaCO ₃	Branco	Marrom-claro	Aveludado
MC	Branco	Amarelo-claro	Aveludado
AA	Branco	Branco	Aveludado

* De acordo com Munsell (2009). AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Em relação ao isolado de *C. fumosorosea*, as colônias apresentaram coloração que variou de vermelho-claro a branco (figura 1); já o reverso da placa de Petri variou entre tons de vermelho e branco. No que diz respeito ao aspecto das colônias, verificou-se que em todos os meios de cultura utilizados o isolado tinha como característica o aspecto aveludado (tabela 5). Em contrapartida, Lopes *et al.* (2021) observaram as colônias de *C. fumosorosea* em meio SAB com aspecto cotonoso e cor branca. Tal fato pode ser explicado pelos diferentes meios de cultura empregados.

Tabela 5 – Coloração e aspecto das colônias de *C. fumosorosea* em diferentes meios de cultura*.

Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
BDA	Vermelho-claro	Vermelho-claro	Aveludado
V8CaCO ₃	Vermelho-claro	Vermelho-claro	Aveludado
MC	Vermelho-claro	Vermelho-brilhante	Aveludado
AA	Branco	Branco	Aveludado

* De acordo com Munsell (2009). AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Os isolados de *M. anisopliae* apresentaram micélio aéreo da colônia que variou entre tons de verde, amarelo e branco (figura 1). Já a coloração do reverso da placa de Petri atingiu tons de amarelo, verde-oliva e branco. As colônias de *M. anisopliae* tiveram como principal característica o aspecto aveludado em todos os meios de cultura testados (tabela 6). Corroborando o presente estudo, Jones (2017) verificou em isolados de *Metarhizium* spp. que inicialmente as colônias tinham coloração branca, tornando-se amarelas com o início da produção de conídios, que se concentraram mais ao centro e, com o amadurecimento, conferiram às colônias colorações variadas em tonalidades de verde-oliva. O autor notou ainda que o reverso das colônias apresentou colorações de amarelo-claro a alaranjado e que, em geral, as colônias tinham aspecto pulverulento e crescimento de aparência entre lisa e zonada. É importante destacar que a variação na coloração das colônias no reverso das placas de Petri se dá principalmente por conta da influência dos diferentes meios de cultura.

Tabela 6 – Coloração e aspecto das colônias de *M. anisopliae* em diferentes meios de cultura*.

Isolado	Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
IBCB 348	BDA	Verde-acinzentado	Amarelo-claro	Aveludado
IBCB 348	V8CaCO ₃	Verde-acinzentado	Verde-oliva-acinzentado	Aveludado
IBCB 348	MC	Amarelo	Amarelo	Aveludado
IBCB 348	AA	Branco	Branco	Aveludado
IBCB 425	BDA	Verde-acinzentado	Amarelo-claro	Aveludado
IBCB 425	V8CaCO ₃	Verde-acinzentado	Verde-oliva-acinzentado	Aveludado
IBCB 425	MC	Amarelo	Amarelo	Aveludado
IBCB 425	AA	Branco	Branco	Aveludado

* De acordo com Munsell (2009). AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Cabe ressaltar que a coloração da colônia e do reverso se apresentou na cor branca, quando avaliado o meio de cultura ágar-água, em todos os isolados estudados. Novamente, deve-se considerar que esse meio de cultura possui uma menor quantidade de nutrientes, o que interferiu no desenvolvimento dos fungos e conseqüentemente impediu que estes atingissem a coloração característica observada nos demais meios de cultura utilizados neste experimento.

CONCLUSÕES

Os meios de cultura influenciam nas características morfofisiológicas dos isolados de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae*.

Considerando a viabilidade econômica, o meio de cultura BDA é o mais recomendado para a produção massal de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de insetos-praga.

REFERÊNCIAS

- Abati, K. Produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) por fermentação líquida e sólida. [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2015.
- Barbosa, R. H., Kassab, S. O., Pereira, F. F. & Rossoni, C. Controle químico e biológico de *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae) para regiões produtoras de cana-de-açúcar de Mato Grosso do Sul. *Ambiência*. 2015; 12(1): 247-255.
doi: <https://doi.org/10.5935/ambiencia.2015.01.15nt>
- Bezerra, S. Q. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. para o controle biológico de *Rhipicephalus microplus* a partir da caracterização morfológica e molecular e testes de patogenicidade. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2012.
- Cano, E. F. R., Nimet, M. S., Batistella, M. A., Maiorki, F. M., Gibbert, F. J. & Mascaro, M. H. N. Crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em diferentes meios de cultura. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*. 2020; 3(4): 3119-3126.
doi: <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n4-032>
- Chávez, B. Y., Rojas, J. C., Barrera, J. F. & Gómez, J. Evaluación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Pachycoris torridus* en Laboratorio. *Southwestern Entomologist*. 2016; 41(3): 783-790.
doi: <https://doi.org/10.3958/059.041.0320>
- Escobar-Ramírez, S., Grassa, I., Armbrecht, I. & Tscharnik, T. Biological control of the coffee berry borer: main natural enemies, control success, and landscape influence. *Biological Control*. 2019; 136.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.05.011>
- Fernandes, É. K. K., Keyser, C. A., Rangel, D. E. M., Miller, M. P. & Roberts, D. W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*. 2010; 108(1): 115-128.
doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04422.x>
- Ferreira, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*. 2014; 38(2): 109-112.
doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- Fomentini, M. A., Alves, L. F. A., Schapovaloff, M. E., Mamprim, A. K., Bonini, A. K. & Pinto, F. G. da S. Characterization and activity of entomopathogenic fungi isolates against "Paraguay tea ampul" (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 2015; 36(6): 3553-3566.
doi: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6p3553>
- Fontes, E. M. G., Pires, C. S. S. & Suji, E. R. Estratégias de uso e histórico. In: Fontes, E. M. G. & Valadares-Inglis, M. C. (Ed.). Brasília: Embrapa; 2020. p. 21-44.

García, M. A. G., Cappello, S. G., Leshner, J. M. G. & Molina, R. F. M. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatogénicos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Horizonte Sanitário. 2011; 10(2): 21-28.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. Relatório 2019. 2019. [Acesso em: 22 jun. 2021]. Disponível em: <https://iba.org/eng/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>.

Jones, G. A. Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2017.

Lopes, R. B., Souza, D. A., Rocha, L. F. N., Montalva, C., Luz, C., Humber, R. A. & Faria, M. *Metarhizium alvesi* sp. nov.: a new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. Journal of Invertebrate Pathology. 2018; 151: 165-168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.12.001>

Lopes, R. S. da, Oliveira, L. G. da, Costa, A. F. da, Correia, M. T. S., Lima, E. A. L. A. & Lima, V. L. M. Efeito dos extratos de *Agave sisalana* sobre espécies de *Cordyceps*. Revista de Biologia e Ciências da Terra. 2021; 21(2): 22-32.

Maguire, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science. 1962; 2(2): 176-177.

Mapa – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Acesso em: 10 jun. 2021]. Disponível em: <https://agricultura-br.com/>.

Martins, C. C. Seleção e caracterização de isolados do fungo *Beauveria bassiana* visando o controle do ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae) [Dissertação de Mestrado]. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2014.

Munsell, A. H. Munsell Soil Color Charts. Macbeth Division of Kollmorgen Instruments Corporations; 2009.

Nozaki, M. H., Camargo, M. E. & Barreto, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. Fitopatologia Brasileira. 2004; 29(4): 429-432.

Ortiz, A. G., Peres Filho, O., Santos, A., Souza, M. D., Favares, L. G. & Nascimento, D. A. Resposta do forrageamento de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) a mudas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. com diferentes restrições nutricionais. Revista Espacios. 2017; 38(44).

Rodrigues, C. J. B., Freitas, M. C., Perinotto, W. M., Fiorotti, J. P., Quinelato, S., Camargo, M. G., Angelo, I. C. & Bittencourt, V. R. E. P. Estudo morfológico de isolados de *Beauveria bassiana* antes e após reisolamento em *Rhipicephalus microplus*. Revista Brasileira de Medicina Veterinária. 2016; 38(3): 91-97.

Sene, L., Alves, L. F. A., Lobrigatte, M. F. P. & Thomazoni, D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. Arquivos do Instituto Biológico. 2010; 77(3): 449-456.

Valadares-Inglis, M. C., Lopes, R. B. & Faria, M. R. Controles de artrópodes-praga com fungos entomopatogênicos. In: Fontes, E. M. G. & Valadares-Inglis, M. C. (Ed.). Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília: Embrapa; 2020. p. 201-236.

Zanuncio, J. C., Lacerda, M. C., Cruz, R. A., Brugger, B. P., Pereira, A. I. A., Wilcken, C. F., Serrão, J. E. & Sedyama, C. S. Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Ecotoxicology and environmental safety. 2018; 147: 245-250. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.055>