

VARIABILIDADE NATURAL PARA CRESCIMENTO,
CONIDIAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRA-VIOLETA EM
Metarhizium anisopliae (METSCH) SOROKIN

Sílvia Maria Frigo ¹
João Lúcio de Azevedo ¹

INTRODUÇÃO

Embora os inseticidas químicos tenham representado um avanço no combate aos insetos indesejáveis, a emergência de mutantes na população de insetos que são resistentes aos mesmos, torna muitas vezes a sua utilização pouco eficiente. Além do mais, com o uso abusivo e indiscriminado de inseticidas químicos, outros problemas podem surgir entre os quais a eliminação dos inimigos naturais do inseto indesejável e os efeitos tóxicos dos mesmos em animais e no próprio homem. Finalmente, o uso de inseticidas representa uma medida anti-econômica em certas condições, especialmente em regiões tropicais. Dessa forma, no que se refere ao controle de pragas agrícolas, visando a preservação das condições naturais previamente existentes e a diminuição dos gastos, tem se dado ênfase ao uso do controle integrado. Neste, alia-se o controle químico e biológico, além de outras práticas agrícolas, de modo a reduzir as populações de insetos pragas e mantê-las a um nível tal que não causem danos econômicos às culturas.

Quanto ao controle microbiológico, o fungo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin tem papel de destaque, principalmente no Brasil (AQUINO, 1974; AQUINO et alii, 1975; NAVES, 1980), onde ele já é produzido em escala industrial por órgãos governamentais e firmas particulares. Sua utilização ocorre especialmente no controle de cigarrinhas de pastagens e cana-de-açúcar. Para que esse controle seja o mais eficiente pos-

¹ Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP.

sível, é necessário o uso de linhagens apropriadas que possuam qualidades como: alta eficiência no controle dos insetos pragas, fácil disseminação, resistência a condições adversas, além de qualidades industriais, como ótima conidiação e taxa de crescimento elevada. Essas qualidades podem existir em linhagens isoladas da natureza ou serem conseguidas por indução de mutações. Para um programa de melhoramento é importante o estabelecimento do nível de variabilidade natural que ocorre em linhagens selvagens com relação a características desejáveis; é importante, também, a verificação da possibilidade do isolamento de mutantes induzidos por agentes mutagênicos. O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar a variabilidade natural existente em 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae* com relação à taxa de crescimento, produção de esporos, assim como a sobrevivência de determinadas linhagens à luz ultra-violeta.

O caráter resistência à luz ultra-violeta é importante não só para a sobrevivência de conídios quando aplicados em condições de campo, como também o estabelecimento de curvas de sobrevivência, facilitando o posterior uso desse agente mutagênico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as seguintes linhagens:

Linhagem	Local do isolamento	Hospedeiro original
A4	Salvador (BA)	<i>Mahanarva posticata</i>
A19	Salvador (BA)	<i>Deois schach</i>
C	Recife (PE)	<i>M. posticata</i>
E6, E9	Vitória (ES)	<i>Deois flavopicta</i>
K	Jahú (SP)	<i>D. flavopicta</i>
M	Manaus (AM)	<i>Deois</i> sp.
MT	Mato Grosso	<i>Deois</i> sp.
AL	Maceió (AL)	<i>M. posticata</i>
PE(PL ₅)	Pernambuco	<i>M. posticata</i>
MJ (major)	USA	

Todas as linhagens foram classificadas como *M. anisopliae* var. *anisopliae* com exceção da linhagem MJ classificada como *M. anisopliae* var. *major*. As linhagens foram mantidas em meio completo sólido inclinado a 49°C.

Meios de cultura: foi usado em todos os experimentos o meio completo sólido (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

Crescimento e produção de conídios: conídios das 11 linhagens foram suspensos em solução salina (0,85%) contendo o agente espalhante Tween 80 (0,1% v/v) e semeados com diluições apropriadas em placas com meio completo. Microcolônias de cada linhagem com 48 horas de desenvolvimento foram transferidas para o centro de placas de Petri com meio completo e frascos com tampa de baquelite fracamente rosqueadas contendo o mesmo meio de cultura e incubadas a 28°C. A determinação da taxa de crescimento das colônias nas placas foi efetuada do 5º ao 10º dia de incubação, pela medida do diâmetro das mesmas. Concomitantemente foi determinada a quantidade de conídios produzidos nos frascos. Para tal, adicionou-se 2,5 ml de solução de Tween 80 (0,1% v/v) e após forte agitação, com auxílio de uma pipeta, retiraram-se alíquotas da suspensão, para contagem dos conídios em câmara de Neubauer.

Sobrevivência à luz ultravioleta: conídios de 5 linhagens (E₆, E₉, A₄, M e MJ) foram submetidos a diferentes tempos de irradiação (0, 1, 2, 4 e 8 minutos) por luz ultravioleta (254 nm), com fluxo de 1 J/m²/seg. Após irradiação, os conídios foram semeados, com diluições apropriadas, em placas contendo meio completo. Incubou-se por 4 dias a 28°C. A contagem de colônias nas placas permitiu o estabelecimento das curvas de sobrevivência.

RESULTADOS

O quadro I apresenta os valores médios obtidos para o diâmetro das colônias das diferentes linhagens de *M. anisopliae*. No quadro II são apresentados os resultados relativos à produção de conídios das 11 linhagens de

ADRO I - Crescimento de 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae* do 5º ao 10º dia de crescimento (médias de 4 a 12 repetições).

Linhagens	Diâmetro (cm) dias					
	5º	6º	7º	8º	9º	10º
	0,90	1,28	1,78	2,23	2,83	3,25
	1,26	1,84	2,40	2,85	3,50	4,07
	0,54	1,12	1,70	2,17	2,90	3,24
	0,70	1,30	2,14	2,52	3,28	3,75
	0,60	1,25	1,72	2,30	2,75	3,77
	0,70	1,10	1,62	2,17	2,62	2,91
	0,42	0,92	1,45	1,52	2,32	2,55
	0,59	1,18	1,93	2,48	3,17	3,83
	0,60	1,12	1,50	2,10	2,37	2,90
	0,87	1,30	1,94	2,44	2,94	3,47
	0,44	0,80	1,17	1,50	2,01	2,30

DRO II - Produção de conídios ($\times 10^5/\text{ml}$) em 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae* do 5º ao 10º dia de desenvolvimento em meio completo (MC). (Médias de 4 a 12 repetições).

Linhagens	Dias				
	5º	6º	7º	8º	10º
	0,10	1,40	8,03	12,26	169,33
	1,28	12,05	34,88	34,70	286,33
	0,07	18,94	19,25	248,19	536,60
	5,73	17,91	52,93	224,66	932,00
	0,57	0,50	0,55	28,60	511,00
	0,00	0,32	8,52	19,90	92,10
	0,00	0,00	0,02	0,66	1,75
	0,00	0,34	16,30	68,40	420,67
	52,50	55,00	31,50	191,00	330,00
	0,30	2,36	5,17	24,26	97,66
	0,25	0,53	2,82	141,43	1030,00

porcentagens relativas dos conídios sobreviventes à ultra violeta em 5 linhagens analisadas estão resumidos no quadro III e figura 1.

DISCUSSÃO

Taxa de crescimento: como se verifica pelo quadro I, a taxa de crescimento das linhagens de *M. anisopliae* variou bastante. Em geral, linhagens que apresentam menor crescimento inicial, como a M e A1, continuaram sendo as de menor taxa de crescimento até o 10º dia, enquanto que a linhagem A19, que alcançou maior diâmetro no 5º dia, continuou sendo também a de maior taxa de crescimento até o 10º dia. Entretanto, nota-se que as linhagens K, C, PE e MJ não seguiram exatamente esse padrão, pois apesar de apresentarem um bom crescimento inicial, foram superadas pelas linhagens E6, E9 e MT ao atingirem o 10º dia de desenvolvimento.

Verifica-se, portanto, que na maioria dos casos há possibilidade de uma seleção entre linhagens que apresentam melhor taxa de crescimento já no 5º dia de desenvolvimento ou talvez até antes, com sensível economia de tempo, no processo de seleção. Uma vez que já é possível o cruzamento dentro de linhagens (MESSIAS & AZEVEDO, 1980) e mesmo entre linhagens através da fusão de protoplastos (SILVEIRA, 1983), a variabilidade existente quanto a esse caráter permite posterior estudo para a de terminação da genética do crescimento em *M. anisopliae*. Por exemplo, o cruzamento da linhagem A19, a de maior crescimento nas condições usadas, com AL, a de menor crescimento, possibilitaria melhor conhecimento da natureza genética da taxa de crescimento e permitiria que um programa de melhoramento, visando obter-se recombinantes de alta taxa de crescimento e outras características desejáveis, pudessem ser desenvolvidas.

Produção de conídios: pelo quadro I, verifica-se que também a produção de conídios em termos cumulativos variou bastante entre as linhagens. Contudo, nota-se que dentro da mesma linhagem existe uma correlação (variando de 0,71 a 1,00) no que se refere ao diâmetro da colônia (quadro I).

JADRO III - Número de conídios ($\times 10^5$ /ml) e porcentagem de sobrevivência (UV) de 5 linhagens de *Metarhizium anisopliae*. (Médias de 2 repetições).

Linhagens	Tempo de irradiação (minutos)				
	0	1	2	4	8
	4,70 (100%)	4,60 (97,87%)	3,50 (74,46%)	1,40 (29,79%)	0,06 (1,27%)
	6,53 (100%)	3,53 (54,05%)	0,06 (0,96%)	0,02 (0,30%)	0,01 (0,16%)
	3,16 (100%)	1,23 (38,90%)	0,62 (19,62%)	0,05 (1,61%)	(0,001) (0,03%)
	7,77 (100%)	7,50 (96,52%)	3,84 (49,42%)	2,33 (29,98%)	0,06 (0,77%)
	9,76 (100%)	5,93 (60,75%)	1,66 (17,00%)	0,41 (4,20%)	0,05 (0,50%)

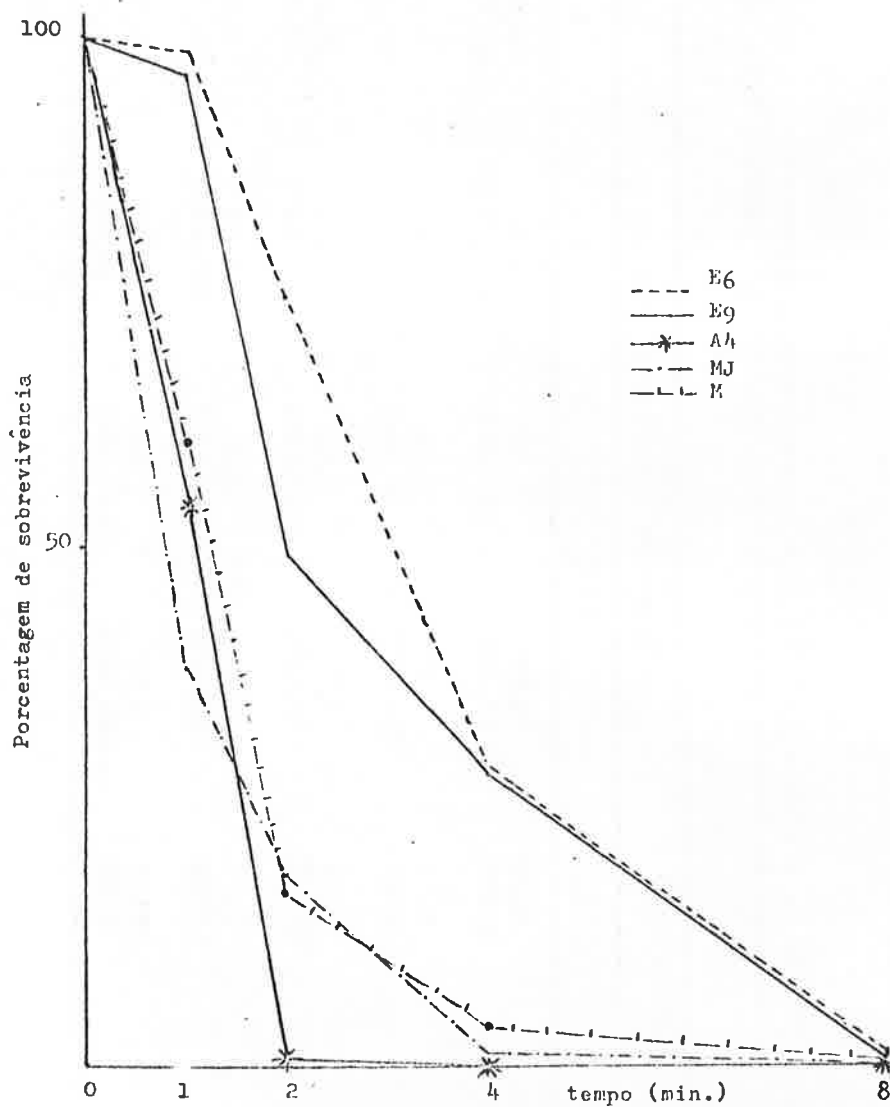


FIGURA 1 - Curvas de sobrevivência à luz UV de 5 linha-

esse demonstrado estatisticamente pelo coeficiente de correlação de Spearman (rs).

Evidentemente, quanto maior o diâmetro da colônia, maior a produção de conídios dentro da mesma linhagem. Entretanto, observa-se também que entre linhagens, algumas delas apresentam um menor diâmetro em relação às outras, apesar de possuírem boa produção de conídios; este é o caso da linhagem M (quadros I e II). Também nem sempre uma linhagem que apresenta boa produção de conídios no início do crescimento será melhor no final. Assim, por exemplo, nota-se que a linhagem PE, a que mais produziu conídios no 5º dia de desenvolvimento, foi a 6ª classificada no final, enquanto que a linhagem M, melhor produtora no 10º dia, até o 8º dia foi superada por outras linhagens menos produtivas. Esses dados são de grande importância do ponto de vista do melhoramento genético, onde esses fatores têm que ser levados em consideração quando se selecionam mutantes para alta conidiação. Assim, por exemplo, o cruzamento da linhagem E₉, uma das mais eficientes usadas no controle biológico (MESSIAS, não publicado), com a linhagem M (a que mais produziu conídios), poderia resultar em um aumento da produção de conídios aliados a alta agressividade nos recombinantes. Outro fato evidente, é que em geral as linhagens apresentam um pico de produção ao redor do 7º e 8º dias. Uma explicação possível para esse fato, poderia estar relacionada a uma diminuição de nutrientes do meio, parcialmente consumidos, o que criaria condições adversas ao crescimento linear, proporcionando intensa conidiação. Aliados aos estudos genéticos, seria interessante o desenvolvimento de pesquisas visando reduzir o tempo necessário para a produção de conídios, com evidentes vantagens industriais.

Sobrevivência à luz ultravioleta: utilizando-se a luz ultravioleta, foi possível a construção da curva de sobrevivência em 5 linhagens de *M. anisopliae* (quadro III e figura 1), evidenciando-se uma correlação entre dose e efeito produzido. A dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios foi obtida com um tempo de 1,95 minutos para a linhagem A₄; 3,60 e 3,80 para MJ e M respectivamente e entre 7,35 e 7,80 minutos para as linhagens E₉ e E₆ com

mo nas características analisadas anteriormente, as linhagens apresentaram diferentes respostas à luz ultravioleta, indicando também nesse caso uma alta variabilidade quanto à resistência natural em relação a esse agente.

De qualquer modo, conclui-se que a variabilidade é bastante grande nas linhagens da espécie *M. anisopliae* para os caracteres analisados, o que permitirá o desenvolvimento de programa de melhoramento genético na espécie, sem a necessidade inicial da indução de mutantes.

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar a variabilidade natural existente em 11 linhagens do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, com relação ao crescimento, produção de conídios e sobrevivência à luz ultravioleta. Os resultados indicaram a existência de uma alta variabilidade entre linhagens quanto ao crescimento e produção de conídios. As linhagens que apresentaram maior conidiação foram M, E₆, A₄ e E₉. Com relação à luz ultravioleta, as linhagens E₉ e E₆ foram as mais resistentes entre as linhagens analisadas. Os resultados mostram que um programa de melhoramento genético na espécie pode ser conduzido utilizando a variabilidade natural já presente na mesma.

SUMMARY

The natural variability presented in eleven strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* was studied. The characters colony growth, conidia production and survival to ultraviolet light were considered. The results showed the occurrence of a high variability among the strains used for all traits analyzed. High conidia production was detected in strains M, E₆, A₄ and E₉. Strains E₉ and E₆ presented higher ultraviolet resistance in relation to other strains. The results show that a breeding programme can be carried out using the

LITERATURA CITADA

- AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agrônomicas* 72: 1-26.
- AQUINO, M.L.N., V.A.L.B. CAVALCANTI, R.C. SENA & G. F. QUEIROZ, 1975. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. *Boletim Técnico da CODECAP* 4: 1-31.
- AZEVEDO, J.L. & S.O.P. da COSTA, 1973. *Exercícios Práticos de Genética*, Ed. USP, 288p.
- MESSIAS, C.L. & J.L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality in deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of British Mycological Society* 75: 473-477.
- NAVES, M.A., 1980. As cigarrinhas das pastagens e sugestões para o seu controle, Circular Técnica nº 3, 27p., EMBRAPA, C.P.P.C., Brasília, DF.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. McDONALD & A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5: 141-238.
- SILVEIRA, W.D., 1983. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, Piracicaba, ESALQ/USP (Dissertação de Mestrado), 153p.