

**SUBSÍDIOS PARA A PRODUÇÃO DE  
*Sporothrix insectorum* (HOOG & EVANS)<sup>1</sup>**

**A CONTRIBUTION TO THE PRODUCTION  
OF *Sporothrix insectorum* (HOOG & EVANS)**

Ellisângela de S. LOUREIRO<sup>2</sup>  
Antonio BATISTA FILHO<sup>2</sup>  
Luís G. LEITE<sup>2</sup>  
José E. Marcondes de ALMEIDA<sup>2</sup>

**RESUMO**

*O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico com o objetivo de avaliar o crescimento de *Sporothrix insectorum* submerso em meio líquido e o efeito de temperaturas na produção e viabilidade dos conídios do fungo, utilizado para controle do percevejo de renda da seringueira *Leptopharsa heveae* (Drake & Poor, 1935). O primeiro ensaio, visando avaliar o crescimento foi instalado segundo delineamento inteiramente casualizado utilizando-se cinco tratamentos e quatro repetições, formadas por erlenmeyers contendo 100 ml de meio de cultura. Os tratamentos foram representados por quatro, cinco, seis, sete e oito dias de incubação do fungo em agitador, na rotação de 40 rpm, temperatura de 25°C e fotofase de 12 horas. O segundo experimento visando avaliar a produção de conídios foi composto por 3 tratamentos (25, 30 e 35°C) e 10 repetições, sendo os erlenmeyers armazenados por 24 horas. As maiores produções de propágulos ocorreram entre o 6º e o 8º dia enquanto a viabilidade máxima foi observada no 6º dia (98,5%). Na temperatura de 25°C a viabilidade de propágulos foi de 100%.*

**Palavras-chave:** Fungo entomopatológico, Seringueira, *Sporothrix insectorum*.

**ABSTRACT**

*Experiments were carried out in the Biology Institute Biological Control laboratory with the aim of evaluating the growth of *Sporothrix insectorum* submerged in liquid medium, and the effect of temperature on the production and viability of conidium of the fungus, which is used for the control of the rubber tree lace bug, *Leptopharsa heveae* (Drake & Poor, 1935). A first experiment was performed using 5 treatments and four replications, each one represented by an Erlenmeyer flask containing 100 mL of liquid medium. The treatments were represented by the incubation periods of 4, 5, 6, 7, and 8 days related to the fungus growth in a shaker at 40 rpm and 24 °C. A second experiment used 3*

---

<sup>(1)</sup> Projeto financiado pela FAPESP

<sup>(2)</sup> Instituto Biológico, CP 70, CEP 13001-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: batistaf@biologico.br

treatments and 4 replications, each one represented by an Erlenmayer flask containing 100 mL of liquid medium. The treatments were represented by the incubation temperatures of 25, 30 and 35 C. The highest blastospore production occurred between the 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day, while the maximum viability occurred at the 6<sup>th</sup> day (98,5%). The viability below 25 C was 100%.

**Key words:** Entomopathogenic fungi, rubber tree, *Sporothrix insectorum*.

## INTRODUÇÃO

O percevejo de renda da seringueira *Leptopharsa heveae* (Drake & Poor, 1935) (Heteroptera: Tingidae), foi observado no Estado de São Paulo em 1995 atacando seringais no município de Buritama (Batista Filho *et al.*, 1995).

Epizootias do fungo *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans) em populações de *L. heveae*, relatadas por Celestino Filho & Magalhães (1986) nos seringais de Manaus-AM, e testado tanto em ninfas como em adultos, obtiveram um controle de 70 a 100 % para os dois estágios da praga. 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. Giraldo (1993) utilizou o fungo *S. insectorum*, isolado do percevejo *L. heveae*, no controle do tingídeo *Leptoharsa gibbicularina* (Froeschner) em plantações de palma na Colômbia, com controle do percevejo de 73% em laboratório e 47% no campo.

Esse fungo tem sido produzido em larga escala em condições de laboratório e utilizado pelos produtores para o controle de *L. heveae* na cultura da seringueira em diversos Estados do Brasil bem como para o controle de *L. gibbicularina* na cultura de dendê na Colômbia (Giraldo, 1993). Em função do potencial que esse fungo apresenta para o controle de tingídeos, o mesmo está sendo estudado para o controle também da mosca de renda praga da azaleia, *Stephanitis pyrioides* (Leite *et al.*, 1997).

O meio de cultura mais usado para a produção massal de *S. insectorum* têm sido arroz cozido, entretanto, melhor rendimento foi obtido com meio a base de farelo de trigo (50%) acrescido de açúcar (1%) (Junqueira *et al.*, 1987). Meios de cultura naturais líquidos à base de leite de soja e caldo de feijão também têm sido avaliados na produção de fungos

entomopatogênicos (Cruz *et al.*, 1983; Batista Filho *et al.*, 1985).

A produção em escala industrial de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano para uma determinada praga. A pesquisa de novas metodologias de produção é muito importante para tornar o controle microbiano de pragas economicamente viável para ser aplicado em grandes áreas.

Paralelamente à seleção de meios de cultura, é necessário investigar outros fatores que afetam o desenvolvimento desses agentes biocontroladores. Esse trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do período de crescimento e da temperatura na produção e viabilidade dos propágulos do bioinseticida em laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico sediado em Campinas, SP.

O primeiro ensaio, visando avaliar o crescimento do fungo, foi instalado segundo delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se cinco tratamentos e quatro repetições, formadas por erlenmeyers contendo 100 ml de meio de cultura. Os tratamentos foram representados por quatro, cinco, seis, sete e oito dias de incubação do fungo em agitador na rotação 40 rpm, sob temperatura controlada (25°C) e fotofase de 12 horas. O meio de cultura utilizado foi composto por 1000 ml de água destilada, 10g de extrato de levedura e 20g de dextrose submetido a autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Após resfriamento do meio, foi inoculado, em cada erlenmeyer, 1 cm<sup>2</sup> do fungo multiplicado em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Em seguida foram agitados, por 72 horas à 25°C, para promover aeração

do meio e para ocorrer um bom desenvolvimento do patógeno. Para a avaliação da viabilidade dos propágulos, foi pipetado uma alíquota de 1 mL do inóculo do fungo *S. insectorum* de cada erlenmeyer, acrescentando-se 9,0 ml de água destilada estéril autoclavada e agitando por 20 segundos. Em seguida, foram inoculadas 3 gotas da suspensão em placa de Petri contendo BDA, distribuindo-se o inóculo com alça de Drigalsky. Foram preparadas 8 placas de Petri (9 cm de diâmetro) para cada tratamento. O material foi incubado durante 17 horas, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , com fotofase de 12 horas, em câmara de germinação para se avaliar a viabilidade dos propágulos (%). Para a leitura da concentração de propágulos foi utilizada a câmara de Neubauer, realizando-se a contagem de blastósporos em microscópio óptico (aumento de 400x).

O segundo experimento visando avaliar a produção de conídios foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se 3 tratamentos, cada um com 10 repetições. Cada repetição foi formada por uma placa de Petri (9cm de diâmetro) inoculada com o fungo em meio líquido pelo método de espalhamento. Os frascos foram armazenados em câmara de germinação tipo B.O.D. a 25, 30 e  $35^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Para cada tratamento foram utilizados dois frascos de plástico com capacidade de 100 mL, contendo 80 mL de fungo produzido através do processo fermentativo.

A avaliação da viabilidade dos propágulos do fungo foi realizada semelhante ao experimento 1, preparando-se 10 placas para cada tratamento, incubadas por 17 horas a  $26^\circ\text{C}$ , com fotofase de 12 horas.

Os dados dos dois experimentos foram submetidos a análise de variância e as médias foram analisados pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

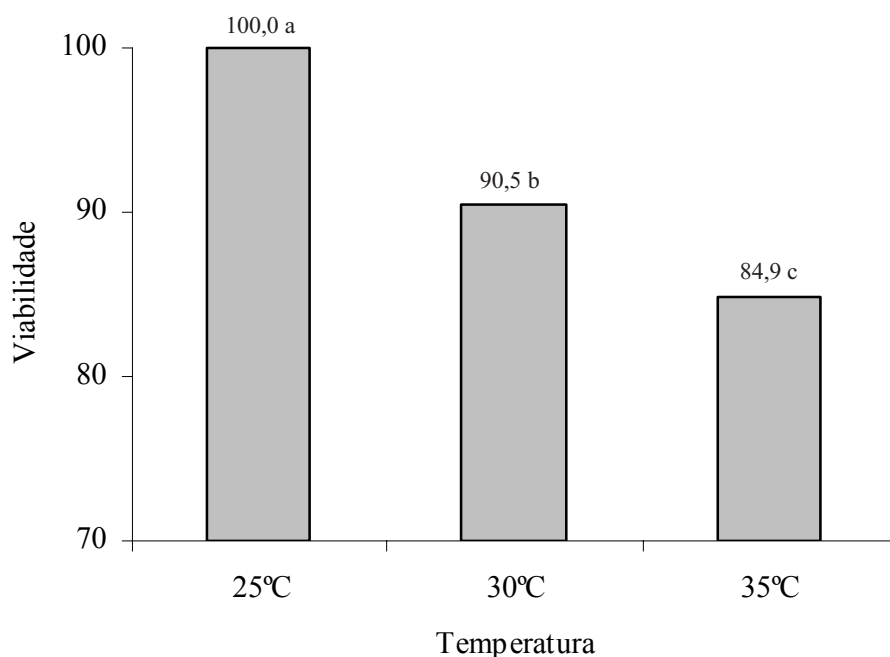
Analisando-se os dados de produção de blastósporos de *S. insectorum*, foi observado que no 6º dia já apresentava produção máxima do propágulo ( $2,59 \times 10^7$ ) com viabilidade de 98,5%, significativamente superior aos demais tratamentos (Tabela 1). Esses dados são semelhantes aos encontrados por Tanzini (2002) que obteve  $6,5 \times 10^7$  conídios/mL, em cultivo na superfície de meio líquido completo (MC). Por outro lado, Oliveira (2000) encontrou um número de conídios da ordem de  $1,6 \times 10^8$  conídios/mL quando produzido na superfície de meio líquido contendo extrato de levedura, na temperatura de incubação entre 25 e  $28^\circ\text{C}$ .

Um dos métodos de produção também muito utilizado é o meio sólido. A esporulação de *S. insectorum* em meio sólido foi estudada por Oliveira (2000). O meio elaborado com extrato de levedura e farelo de trigo produziu  $1,0 \times 10^8$  conídios/g. Em meio de extrato de batata a produção foi de  $5,5 \times 10^8$  conídios/g. Leite *et al.* (1997) obtiveram em meio à base de batata,  $1,8 \times 10^8$  conídios/mL. Uma das desvantagens da produção em meio sólido, composto por qualquer nutriente, é o longo tempo dispendido para a máxima produção de conídios de *S. insectorum*.

**Tabela 1.** Concentração e viabilidade dos propágulos de *Sporothrix insectorum* em função do tempo de fermentação ( $25^\circ\text{C}$ , fotofase de 12 horas).

Tratamentos	Concentração ( $n \times 10^2$ conídios/ml)	Viabilidade (%) <sup>1</sup>
4º dia	1,09 b	76,00 cd
5º dia	1,31 b	85,50 bc
6º dia	2,59 a	98,50 a
7º dia	2,39 a	88,00 b
8º dia	2,11 a	71,25 d
CV (%)	11,97	5,3

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Dados não transformados.



**Figura 1.** Porcentagem de viabilidade dos conídios de *Sporothrix insectorum* armazenados em diferentes temperaturas, por 24 horas.

Ressalta-se que os extremos representados pelo 4º e 8º dias tiveram os menores níveis de viabilidade de blastósporos, respectivamente 76 e 71,25%. No período compreendido entre o 6º e o 8º dia não foi observada diferença significativa quando se considera a produção de blastósporos, indicando que o crescimento tem seu ponto ótimo situado nessa faixa (Tabela 1). Entretanto, a análise conjunta da produção e viabilidade revela que o 6º dia é o mais favorável para a colheita dos blastósporos.

O extrato de levedura fornece ao meio nutrientes essenciais, proporcionando um melhor equilíbrio entre os nutrientes presentes no meio. Experimentos realizados por Oliveira (2000), adicionando-se 0,5 g de extrato de levedura em meios sólidos e líquidos, de uma maneira geral, possibilitou um desenvolvimento mais vigoroso do fungo nos substratos sólidos.

A viabilidade dos conídios do fungo *S. insectorum* produzidos em meio sólido foi de 100 % após 24 horas de armazenamento à temperatura de 25°C (Figura 1). Os conídios após 24 horas, mantidos

às temperaturas de 30 e 35°C, ainda possuíam uma alta viabilidade 90,5 e 84,9%, respectivamente, embora tenha ocorrido diferença significativa entre os tratamentos.

A temperatura é um dos fatores físicos mais importantes para o desenvolvimento e viabilidade de fungos entomopatogênicos. 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.

Considerando os resultados obtidos pode-se afirmar que o 6º dia foi o mais indicado para a colheita do fungo face a maior produção e viabilidade dos propágulos.

## CONCLUSÕES

No 6º dia obteve-se as maiores produção e viabilidade dos propágulos.

Na temperatura de 25°C os propágulos mantêm a viabilidade por pelo menos 24 horas.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BATISTA FILHO A.; LEITE, L.G.; SILVEIRA, A.P. 1995. Ocorrência da mosca de renda *Leptopharsa heveae*, em Buritama, SP. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 62(supl.), p.81.
- CELESTINO FILHO, P. & MAGALHÃES, F.B.L. 1986. Ocorrência do fungo *Sporothrix insectorum* Hoog & Evans, parasitando a mosca da renda (*Leptopharsa heveae* Drake & Poor) em seringal de cultivo. Manaus: EMBRAPA/CNPDS, 2p.
- CRUZ, B.P.B.; ABREU, O.; OLIVEIRA, D.A.; CHIBA, S. 1983. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em meios de cultura naturais líquidos. *Biológico*, São Paulo, 49(5): 111-116.
- GIRALDO, A.I.D.H.G. *Sporothrix insectorum*: methode biologique de controle de la punaise *Leptopharsa gibbicarina* dans les cultures du palmier a huile en Amerique Latine (Hemiptera: Tingidae). *Bull. Soc. Entomol. Fr.*, v.98, n.1, p.77-85, 1993.
- 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: EMBRAPA/CNPDS, 1987. 4p. (Comunicado Técnico, 56).
- LEITE, L.G., BATISTA FILHO, A., OLIVEIRA, S.M.C. 1997. Avaliação de meios de cultura líquidos para a produção do fungo entomopatogênico *Sporothrix insectorum* Hoog & Evans. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.64, p.80. Suplemento.
- MONTEIRO, A.C. Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus). UFSCAR - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p.233, 1988. (Tese de doutorado).
- OLIVEIRA, S.M.C. Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos. UNESP - Universidade Estadual Paulista/ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal-SP, p.45, 2000. (Dissertação de mestrado).
- TANZINI, M.R.; LARA, F.M. 1998 Biologia do percevejo-de-renda-da-seringueira *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Heteroptera: Tingidae). *Ecossistema*, v.23, p.65-67.
- TANZINI, M.R. Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira *Leptopharsa heveae* com fungos entomopatogênicos. ESALQ — Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Piracicaba-SP, p.140, 2002. (Tese de doutorado).