

Artigos

Caracterização morfofisiológica de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de *Oncideres impluviata*

Morphophysiological characterization of entomopathogenic fungi for the biological control of *Oncideres impluviata*

Mateus Alves Saldanha^I , Clair Walker^{II} , Alexsandra Cezimbra Quevedo^I ,
Leandra Pedron^I , Marlove Fátima Brião Muniz^I , Ervandil Corrêa Costa^I 

^IUniversidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^{II}Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

RESUMO

O controle biológico é uma importante ferramenta para o controle de insetos-praga pelas inúmeras vantagens apresentadas e por diminuir os riscos ambientais provocados pelas técnicas de controle químico. No entanto, são escassos estudos referentes à morfofisiologia de microrganismos utilizados nesse método de controle, principalmente no que se refere ao *Oncideres impluviata*, principal inseto-praga da acácia-negra. Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, como uma potencial alternativa para o controle biológico do anelador-da-acácia-negra. Para tanto, foram utilizados cinco isolados de fungos entomopatogênicos (três isolados de *Beauveria bassiana* e dois de *Metarhizium anisopliae*) e avaliados o crescimento micelial, esporulação, coloração e caracterização dimensional dos conídios em diferentes meios de cultura (BDA, V8CaCO₃ e meio completo). Os isolados de *Beauveria bassiana* apresentaram melhor crescimento micelial no meio V8CaCO₃ e maior esporulação no meio de cultura completo; o micélio aéreo se apresentou de cor branca em todos os isolados. Em relação aos isolados de *Metarhizium anisopliae*, o maior crescimento micelial e esporulação ocorreram no meio de cultura completo e a coloração do micélio aéreo variou entre tons de cinza e verde-oliva. Esses resultados vêm a gerar informações preliminares a respeito do uso de fungos entomopatogênicos para o controle do anelador-da-acácia-negra.

Palavras-chave: Anelador-da-acácia-negra; *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT

Biological control is a useful tool for insect pests control due to the many advantages set out and further to reduce the environmental risks caused by chemical control techniques. However, there is a gap in the scientific literature that describes microorganisms' morphophysiology used in this control method, especially in *Oncideres impluviata*, the main pest insect of black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.). Thus, this study aimed to perform morphophysiology characterization of isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as a potential alternative for the biological control of twig girdler of black wattle. So, five isolates of entomopathogenic fungi (three isolates of *Beauveria bassiana* and two of *Metarhizium anisopliae*) were used. Also, mycelial growth, sporulation, staining was evaluated. Additionally, a dimensional characterization of conidia in different culture media (BDA, V8CaCO₃, and complete medium) was carried out. *Beauveria bassiana* isolates showed better mycelial growth in the V8CaCO₃ medium and greater sporulation in the complete culture medium; the aerial mycelium presented a white color in all isolates. These results allow producing preliminary information regarding the use of entomopathogenic fungi for the control of the twig girdler of black wattle.

Keywords: Black acacia annoyant; *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de florestas plantadas no Brasil tem se expandido e caracteriza-se atualmente pela diversidade de produtos e serviços, compreendendo um conjunto de atividades que incluem desde a produção e a colheita até a transformação da madeira no produto final (MATEUS; PADILHA, 2017). Essa expansão favoreceu o crescimento da procura de matérias-primas de base florestal e, conseqüentemente, trouxe a introdução de espécies florestais de crescimento rápido. Atualmente, no Rio Grande do Sul, existem três principais maciços florestais de espécies exóticas de maior importância econômica englobando os gêneros *Eucalyptus*, *Pinus* e *Acacia* (SUYENAGA *et al.*, 2015).

A *Acacia mearnsii* De Wild (acácia-negra), apesar de ocupar a menor área plantada em relação aos demais cultivos de espécies arbóreas exóticas, representa significativa importância econômica, visto que no Brasil a maioria dos plantios comerciais com essa espécie estão localizados no estado do Rio Grande do Sul, onde a madeira é utilizada para a produção de celulose e carvão, e da casca é extraído o tanino, empregado principalmente na indústria farmacêutica e coureira (VIEIRA; SCHUMACHER, 2010).

O tanino também é empregado no tratamento de efluentes, na fabricação de colas fenólicas e na clarificação de cervejas e vinhos. Além do tanino, a acácia-negra produz madeira de qualidade para energia, papel e celulose, bem como para fabricação de aglomerados (MAESTRI, 1992).

Entre as espécies de insetos que causam danos à acacicultura, o *Oncideres impluviata* (GERMAR, 1842) (Coleoptera: Cerambycidae), conhecido popularmente como anelador-da-acácia-negra, é considerado o mais importante em decorrência dos danos causados e de sua frequência de ocorrência, além de possuir ampla diversidade de espécies de plantas hospedeiras (OLIVEIRA; COSTA, 2014). Conforme Santos *et al.* (2011), os insetos em sua fase adulta anelam os galhos, causando, assim, a queda deles. Após a queda dos galhos, as fêmeas depositam seus ovos e, na sequência, ocorre o desenvolvimento das larvas. Os danos causados provocam estresses nas árvores atacadas, bem como uma série de alterações na vitalidade e no desenvolvimento da espécie, tais como perda de produtividade, forquilhamento e gomose, levando à morte das plantas.

Atualmente, tem-se instituído o Decreto Estadual Nº 48.304, de 29 de agosto de 2011, que determina o regulamento do controle dessa espécie, em que fica autorizado e recomendado o uso do fogo em plantios comerciais como medida sanitária, visando controlar os prejuízos causados pelo anelador. Contudo, o emprego do fogo não consiste em uma prática ideal, por oferecer riscos aos operadores e possibilitar a ocorrência acidental de eventuais incêndios em áreas florestais. Outro problema que é acarretado pelo uso do fogo se refere à eliminação de inimigos naturais do ambiente, além do inseto-praga (OLIVEIRA; COSTA, 2014). Assim, é fundamental que a pesquisa invista na descoberta de novas formas eficientes, viáveis e menos impactantes para o meio ambiente no controle desse inseto-praga, visando contribuir efetivamente com o setor florestal.

Uma potencial alternativa de controle do anelador-da-acácia-negra pode ser o uso de fungos entomopatogênicos, que são microrganismos que se instalam no corpo de insetos causando sua morte (ALVES, 1998). Os fungos *Beauveria bassiana* e

Metarhizium anisopliae são espécies importantes no controle de pragas em ambientes florestais, sendo base de diversos produtos comerciais. Entre as razões para o uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico de pragas estão suas eficiências em infectar e matar os hospedeiros, suas capacidades em agir sobre todos os estágios evolutivos do hospedeiro, suas grandes variabilidades genéticas, permitindo encontrar o isolado mais virulento para o controle de um grande número de pragas e suas relativas seguranças ambientais (ALVES, 1998; SAMISH; GINSBERG; GLASER, 2004; THOMAS; READ, 2007).

Dessa forma, estudos que visem à caracterização morfofisiológica desses entomopatógenos são importantes, bem como os meios de cultivo mais adequados para os seus desenvolvimentos, pois os nutrientes fornecidos pelos diferentes meios são capazes de induzir ou inibir o crescimento vegetativo e reprodutivo dos fungos. Tais conhecimentos são fundamentais para o estudo do controle biológico de *Oncideres impluviata*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia “Dr^a. Elocy Minussi”, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria.

2.1 Repicagem dos isolados de fungos entomopatogênicos

Foram utilizados cinco isolados entomopatogênicos, sendo três de *Beauveria bassiana* (ESALQ PL63, IBCB 66 e IBCB 170) e dois de *Metarhizium anisopliae* (ESALQ E9 e IBCB 383). Os isolados IBCB 66, IBCB 170 e IBCB 383 foram obtidos junto ao Instituto Biológico de São Paulo, Coleção de Fungos Entomopatogênicos “Oldemar Cardin Abreu”; os isolados ESALQ PL63 e ESALQ E9 foram obtidos da Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, unidade da Universidade de São Paulo.

Para a caracterização morfofisiológica dos isolados de fungos

entomopatogênicos, foram avaliados o crescimento micelial, a esporulação, a dimensão de conídios, a coloração e o aspecto das colônias, onde foram testados três meios de cultura, sendo eles: 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 1000 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 1000 mL de água destilada) (FERREIRA, 2004; MACEDO, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2016). Para a repicagem dos isolados entomopatogênicos, foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), onde foi repicado no centro de cada placa uma pequena quantidade de estruturas do fungo. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 25 ± 2 °C e em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 horas, durante um período de seis dias para crescimento e esporulação dos fungos.

Decorridos os seis dias de crescimento micelial nas placas de Petri contendo os isolados, foram preparadas suspensões de esporos. Foram adicionados 10 mL de água destilada estéril na placa de Petri e, com o auxílio de alça de Drigalski, foi realizada 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 realizar a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Após a contagem de esporos, a suspensão foi calibrada para uma concentração de 1 x 10⁶ esporos por mL.

Com o auxílio de um pipetador, foi transferida uma gota de 10 µL da suspensão de esporos (1 x 10⁶ esporos por mL) no centro de cada placa de Petri, contendo os meios de cultura descritos anteriormente. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmaras do tipo B.O.D. em regime de temperatura e luz controlados (25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas).

2.2 Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos isolados de fungos entomopatogênicos

O crescimento micelial de cada isolado nos diferentes meios de cultura foi avaliado diariamente, até os 15 dias de incubação, mensurando dois sentidos diametralmente opostos da colônia, com auxílio de paquímetro digital.

Ao final dos 15 dias de incubação, realizou-se a avaliação da esporulação dos isolados. Para tanto, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, sendo, em seguida, realizada a raspagem da colônia com auxílio de alça de Drigalski para 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.

2.3 Caracterização dimensional dos conídios e coloração das colônias dos isolados de fungos entomopatogênicos

Para a caracterização dimensional dos conídios, foram preparadas lâminas de microscopia a partir das colônias desenvolvidas apenas no meio de cultura BDA, contendo uma pequena quantidade de esporos dos isolados e corante. A largura e o comprimento de 10 conídios 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 (2009), sendo observada a coloração na parte superior e inferior na placa de Petri e o aspecto da colônia.

2.4 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, em esquema fatorial composto de dois fatores: três meios de cultura x três isolados de *Beauveria bassiana*; três meios de cultura x dois isolados de *Metarhizium anisopliae*. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao agrupamento do teste de Tukey ($p < 0,05$). O software SISVAR versão 5.6.86 foi utilizado para a análise de dados (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos três meios de cultura testados, após 15 dias de crescimento, o diâmetro das colônias dos isolados de *Beauveria bassiana* variou entre 41,55 mm (IBCB 170) e 58,00 mm (ESALQ PL63), apresentando valor médio de 53,32 mm (Tabela 1). Com relação ao isolado IBCB 170, o maior crescimento da colônia se deu no meio de cultura V8CaCO₃ (58,84 mm), seguido dos meios completo (48,12 mm) e BDA (41,55 mm), havendo diferença estatística no crescimento micelial em relação aos meios de cultura. O isolado IBCB 66 também apresentou maior crescimento no meio de cultura V8CaCO₃ (57,46 mm), diferindo estatisticamente dos demais meios, sendo o meio completo com 53,14 mm e o BDA com 51,35 mm. Já para o isolado ESALQ PL63, não houve diferença significativa em relação ao crescimento nos diferentes meios de cultura, sendo o V8CaCO₃ com 58,00 mm, meio completo com 57,48 mm e BDA com 55,79 mm (Tabela 1).

Tabela 1 – Crescimento micelial (mm) de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação

Isolados	BDA	V8CaCO ₃	MC
IBCB 170	41,55 Cc *	58,84 Aa	48,12 Bb
IBCB 66	51,35 Bb	57,46 Aa	53,14 Bb
ESALQ PL63	55,79 Aa	58,00 Aa	57,48 Aa
Média Geral		53,32	
C.V. (%)		1,39	

Fonte: Autores (2020)

Em que: *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. Em que: BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Com relação aos meios de cultura BDA e completo, houve diferenças significativas em relação ao crescimento micelial entre os isolados, sendo o isolado ESALQ PL63 o que apresentou maior crescimento em relação aos demais, com 55,79 mm e 57,48 mm para os meios BDA e completo, respectivamente. O meio de cultura V8CaCO₃ não apresentou diferença estatística entre os isolados em relação ao crescimento micelial final.

Rodrigues *et al.* (2016) observaram, após 10 dias de crescimento em meio de cultura BDA, que *Beauveria 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 *Beauveria 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 *Beauveria bassiana*, diâmetros médios entre 18 e 26 mm. Esses resultados corroboram com o presente estudo, visto que, em meio de cultura BDA, a média de crescimento micelial de *Beauveria bassiana* aos dez dias de incubação foi de 33 mm.

Os resultados de crescimento micelial de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura podem ser observados na Tabela 2. Verificou-se que não houve interação entre os meios de cultura e os isolados. Quando utilizado o meio de cultura completo, ocorreram diferenças estatísticas entre os isolados ESALQ E9 e IBCB 383, com 52,26 mm e 54,65 mm, respectivamente. No entanto, ao testar os meios BDA e V8CaCO₃, observou-se que não ocorreram diferenças estatísticas entre os isolados (Tabela 2).

Tabela 2 – Crescimento micelial (mm) de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação

Isolados	BDA	V8CaCO ₃	MC
ESALQ E9	52,14 a *	53,74 a	52,26 b
IBCB 383	52,95 a	52,96 a	54,65 a
Média geral		53,11	
C.V. (%)		1,25	

Fonte: Autores (2020)

Em que: *Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV = Coeficiente de variação. Em que: BDA = batata-dextrose-água; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Os resultados deste estudo corroboram com o trabalho de caracterização morfológica de *Metarhizium 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) observaram, após 10 dias de crescimento de *Metarhizium anisopliae*, diâmetro de 25 mm, apresentando uma coloração que variou do verde-oliva ao verde escuro. Em contrapartida, Fernandes *et al.* (2010), ao analisarem o tamanho das colônias de isolados de *Metarhizium anisopliae*, encontraram médias de diâmetros inferiores a 70 mm.

Os isolados apresentaram variabilidade na quantidade de conídios produzidos. No caso dos isolados de *Beauveria bassiana*, os valores variaram entre $17,32 \times 10^6$ esporos/mL (ESALQ PL63) e $29,46 \times 10^6$ esporos/mL (ESALQ PL63), sendo o valor médio de $24,04 \times 10^6$ esporos/mL (Tabela 3). O isolado IBSP 170 apresentou maior esporulação no meio completo, com $26,91 \times 10^6$ esporos/mL, diferindo estatisticamente dos demais meios. Para esse mesmo isolado, não houve diferenças estatísticas na quantidade de esporos produzidas nos meios BDA e V8CaCO₃, com $17,35$ e $15,62 \times 10^6$ esporos/mL, respectivamente.

Tabela 3 – Esporulação ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação

Isolados	BDA	V8CaCO ₃	MC
IBCB 170	17,35 Bb *	15,62 Bb	26,91 Aa
IBCB 66	26,16 Aa	27,51 Aa	28,50 Aa
ESALQ PL63	27,62 Aa	17,32 Bb	29,46 Aa
Média Geral		$24,04 \times 10^6$	
C.V. (%)		7,11	

Fonte: Autores (2020)

Em que: *Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação. Em que: BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Com relação ao isolado IBCB 66, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os meios de cultura e a quantidade de esporos produzidas, sendo os valores encontrados de $28,50$, $27,51$ e $26,16 \times 10^6$ esporos/mL para os meios completo,

V8CaCO₃ e BDA, respectivamente. Para o isolado ESALQ PL63, não houve diferenças significativas entre os meios completo e BDA, sendo encontrados 29,46 e 27,62 x 10⁶ esporos/mL, respectivamente. No meio de cultura V8CaCO₃, o isolado ESALQ PL63 apresentou o menor valor de esporulação, sendo encontrado 17,32 x 10⁶ esporos/mL, diferindo estatisticamente dos meios de cultura BDA e completo.

Quando utilizado o meio de cultura BDA, não houve diferenças estatísticas entre os isolados IBCB 66 e ESALQ PL63; já o isolado IBSP 170 apresentou o menor valor de esporulação diferindo estatisticamente dos demais, com 17,35 x 10⁶ esporos/mL. Para o meio de cultura V8CaCO₃, o isolado IBCB 66 apresentou o melhor resultado para essa variável, com diferenças estatísticas significativas em relação aos outros isolados, com 27,51 x 10⁶ esporos/mL. Já em relação ao meio de cultura completo, não houve diferenças estatísticas entre a esporulação dos diferentes isolados.

Rodrigues *et al.* (2016) observaram que os valores encontrados variaram entre 2890 x 10⁴ conídios/mL e 13910 x 10⁴ conídios/mL para isolados de *Beauveria bassiana*. Martins (2014), caracterizando isolados de *Beauveria bassiana*, encontrou valores entre 0,2 a 26,2 x 10⁸ 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 x 10⁷ conídios/colônia. Observando esses resultados, é possível verificar uma maior variação na esporulação dos isolados, onde ocorreram maiores diferenças em relação aos resultados obtidos no presente estudo.

Verificando a produção de conídios no meio de cultura completo, Guimarães *et al.* (2020) observaram, após 10 dias de crescimento do fungo, que *Beauveria bassiana* foi mais produtiva nos substratos arroz, malte A, malte B e fibra de algaroba, não diferindo estatisticamente entre si, com rendimentos de 2,00 x 10⁶; 1,22 x 10⁶; 1,75 x 10⁶ e 2,36 x 10⁶ conídios/grama, respectivamente. A esporulação variou estatisticamente nos substratos bagaço da cana-de-açúcar, sementes e fibras da acerola (0,85 x 10⁶; 0,56 x 10⁶ e 0,54 x 10⁶, respectivamente).

Os resultados de esporulação de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura podem ser observados na Tabela 4. Verificou-se que não houve interação entre os meios de cultura e os isolados. Não houve diferença estatística entre os isolados ESALQ E9 e IBCB 383 quando avaliada a esporulação no meio de cultura completo.

Tabela 4 – Esporulação ($\times 10^6$. mL⁻¹) de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação

Isolados	BDA	V8CaCO ₃	MC
ESALQ E9	6,13 b *	6,17 b	8,31 a
IBCB 383	14,29 a	15 89 a	15,11 a
Média geral		10,98 $\times 10^6$	
C.V. (%)		15,73	

Fonte: Autores (2020)

Em que: *Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação. Onde: BDA = batata-dextrose-água; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Com relação à caracterização dimensional dos conídios, os isolados de *Beauveria bassiana* apresentaram largura e comprimento médio de conídios de 2,5 μm x 2,5 μm . Para os isolados de *Metarhizium anisopliae*, foi observada largura média dos conídios de 2,5 μm ; em relação ao comprimento, os conídios apresentaram média de 6,0 μm para o isolado ESALQ E9 e 5,75 μm para o isolado IBCB 383.

Para os isolados de *Beauveria 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 apresentou variação entre amarelo e marrom. Em relação ao aspecto das colônias, os isolados apresentaram como característica o aspecto aveludado, sendo que o isolado ESALQ PL63 se mostrou com o centro da colônia pulverulento (Tabela 5). Corroborando com o presente trabalho, Rodrigues *et al.* (2016) verificaram que as colônias de *Beauveria bassiana* apresentaram coloração esbranquiçada, com pequenas regiões variando em tonalidade para branco-amareladas.

Tabela 5 – Coloração e aspecto das colônias de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura

Isolado	Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
ESALQ PL63	V8CaCO ₃	branco	amarelo	aveludado, centro pulverulento
ESALQ PL63	BDA	branco	amarelo-claro	aveludado, centro pulverulento
ESALQ PL63	MC	branco	marrom-amarelado claro	aveludado, centro pulverulento
IBCB 170	V8CaCO ₃	branco	marrom-claro	aveludado
IBCB 170	BDA	branco	amarelo-claro	aveludado
IBCB 170	MC	branco	amarelo-claro	aveludado
IBCB 66	V8CaCO ₃	branco	marrom-claro	aveludado
IBCB 66	BDA	branco	amarelo-claro	aveludado
IBCB 66	MC	branco	amarelo-claro	aveludado

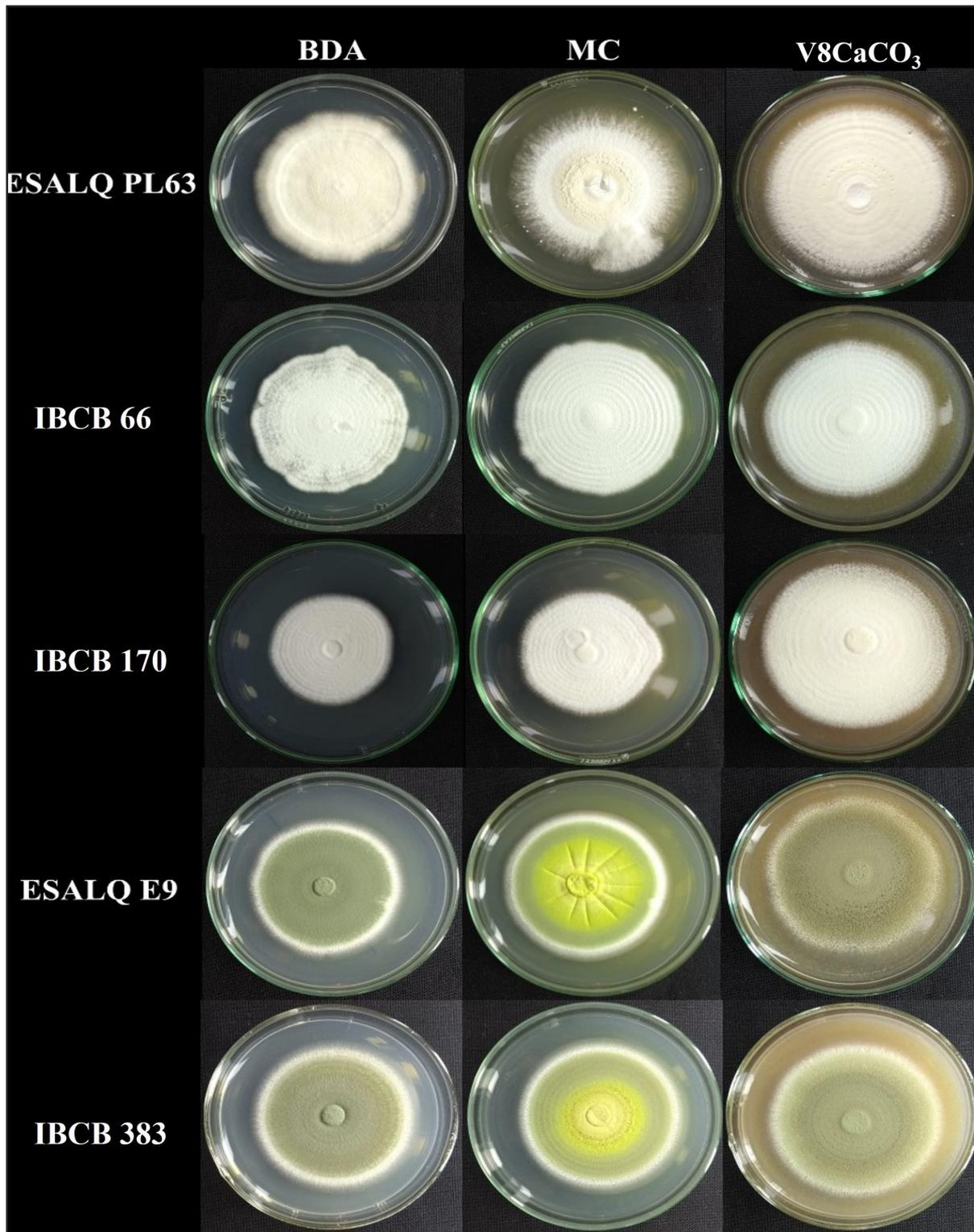
Fonte: Autores (2020)

Em que: BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Os isolados de *Metarhizium anisopliae* apresentaram micélio aéreo da colônia que variou entre tons de cinza e verde-oliva (Figura 1 e Tabela 6); já a coloração do reverso apresentou uma maior variação na coloração, sendo observados tons de amarelo, verde e marrom (Tabela 6). A variação na coloração das colônias no reverso das placas de Petri se dá principalmente devido à influência dos diferentes meios de cultura.

Corroborando com o presente estudo, Jones (2017) verificou em isolados de *Metarhizium* spp. que inicialmente as colônias apresentaram 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 que variaram em tonalidades de verde-oliva. Verificou ainda que o reverso das colônias apresentou colorações que variaram de amarelo claro a alaranjado, e que, em geral, as colônias apresentaram aspecto pulverulento e crescimento de aparência entre lisa e zonada.

Figura 1 – Coloração e aspecto das colônias de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura, após 15 dias de incubação



Fonte: Autores (2020)

Em que: ESALQ PL63, IBCB 66 e IBCB 170 = isolados de *Beauveria bassiana*; ESALQ E9 e IBCB 383 = isolados de *Metarhizium anisopliae*; BDA = batata-dextrose-ágar; MC = meio completo; V8CaCO₃ = suco de vegetais.

O aspecto das colônias de *Metarhizium anisopliae* apresentou como principal característica o aspecto aveludado em todos os meios de cultura testados (Tabela 6).

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

Isolado	Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
ESALQ E9	V8CaCO ₃	cinza	marrom-claro	aveludado
ESALQ E9	BDA	verde-acinzentado	amarelo-claro	aveludado
ESALQ E9	MC	verde-oliva	amarelo-claro	aveludado
IBCB 383	V8CaCO ₃	cinza	verde-oliva-acinzentado	aveludado
IBCB 383	BDA	cinza	amarelo	aveludado
IBCB 383	MC	verde-oliva-claro	amarelo	aveludado

Fonte: Autores (2020)

Em que: BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Bischoff, Rehner e Humber (2009), em uma revisão taxonômica do gênero, observaram que a pigmentação das colônias dos isolados pertencentes a *Metarhizium anisopliae* inicialmente é branca, ficando amarela nos estágios iniciais de desenvolvimento dos conídios, tornando-se verde com o seu amadurecimento, com colônias geralmente apresentando coloração variável entre verde-oliva e suas diversas tonalidades. Essas observações corroboram com os resultados do presente estudo, onde a maioria das colônias apresentaram coloração que variou entre tonalidades de verde-oliva, com algumas colônias com o centro da placa de Petri com coloração amarela, quando utilizado o meio completo.

4 CONCLUSÕES

O meio de cultura mais recomendado para o crescimento micelial de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* é o V8CaCO₃ e, para uma maior produção de esporos, o meio de cultura completo.

Os meios de cultura não influenciam na coloração do micélio aéreo de *Beauveria bassiana*, apresentando coloração branca. No entanto, para *Metarhizium anisopliae*, a coloração variou entre tons de cinza e verde-oliva.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. 1163 p.
- 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**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.
- FERNANDES, É. K. K. *et al.* Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 115-128, 2010.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, J. M. S. **Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos 1: *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros, 2004. 26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 3).
- FOMENTINI, M. A. *et al.* Characterization and activity of entomopathogenic fungi isolates against "Paraguay tea ampul" (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 3553-3566, 2015.
- GARCÍA, M. A. G. *et al.* Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. **Horizonte Sanitário**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 21-28, 2011.
- GUIMARÃES, A. G. L. P. *et al.* Alternative substrates for conidiogenesis of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 80, n. 1, p. 133-141, 2020.

JONES, G. A. **Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios in vitro da virulência e conidiogênese.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de *Mahamarva fimbriata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar.** 2005. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MAESTRI, R. **Estimativa de produção presente e futura de volume de madeira e peso de casca para povoamentos de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild).** 1992. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

MARTINS, C. C. **Seleção e caracterização de isolados do fungo *Beauveria bassiana* visando o controle do ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae).** 2014. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2014.

MATEUS, R. J. G.; PADILHA, D. G. Avaliação multicritério da fragilidade do território no Brasil: A silvicultura no estado do Rio Grande do Sul. **Finiterra**, [s. l.], n. 104. p. 73-104, 2017.

MUNSELL Soil Color Charts. [S. l.]: Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporations, 2009.

OLIVEIRA, L. da S.; COSTA, E. C. Insetos aneladores em povoamentos florestais. In: CANTARELLI, E. B.; COSTA, E. C. **Entomologia florestal aplicada.** 1. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2014. p. 57-70.

RODRIGUES, C. J. B. *et al.* Estudo morfológico de isolados de *Beauveria bassiana* antes e após reisolamento em *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 91-97, 2016.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLASER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, [s. l.], v. 129, p. 389-403, 2004.

SANTOS, A. F. *et al.* Impacto potencial das mudanças climáticas sobre a gomose da acácia-negra no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. p. 119-128.

SUYENAGA, E. S. *et al.* Acácia-negra: potenciais usos de reaproveitamento. **Revista Conhecimento Online**, [s. l.], v. 1, n. 7, p. 2-7, 2015.

THOMAS, M. B.; READ, A. F. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 377-383, 2007.

VIEIRA, M.; SCHUMACHER, M. V. Deposição de serapilheira e de macronutrientes em um povoamento de Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 2, p. 225-233, 2010.

Contribuição de Autoria

1 – Mateus Alves Saldanha

Engenheiro Florestal

<https://orcid.org/0000-0002-1788-8179> • mtsmateusalves@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Curadoria de dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Validação, Visualização de dados (tabelas), Escrita – primeira redação, Escrita – revisão e edição

2 – Clair Walker

Engenheira Florestal, Dra., Professora

<https://orcid.org/0000-0002-6707-3963> • clairwalker@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Curadoria de dados, Metodologia, Supervisão, Visualização de dados (tabelas), Escrita – revisão e edição

3 – Aleksandra Cezimbra Quevedo

Engenheira Florestal

<https://orcid.org/0000-0002-2751-1068> • alequevedo1997@gmail.com

Contribuição: Investigação, Escrita – revisão e edição

4 – Leandra Pedron

Engenheira Florestal

<https://orcid.org/0000-0002-0712-241X> • leandra_pedron@hotmail.com

Contribuição: Investigação, Escrita – revisão e edição

5 – Marlove Fátima Brião Muniz

Engenheira Agrônoma, Dra., Professora

<https://orcid.org/0000-0001-7436-9589> • marlovemuniz@yahoo.com.br

Contribuição: Conceituação, Supervisão, Validação, Escrita – revisão e edição

6 – Ervandil Corrêa Costa

Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor

<https://orcid.org/0000-0001-7348-8826> • ervandilc@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Supervisão, Escrita – revisão e edição

Como citar este artigo

Saldanha, M. A.; Walker, C.; Quevedo, A. C.; Pedron, L.; Muniz, M. F. B.; Costa, E. C. Caracterização morfofisiológica de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de *Oncideres impluviata*. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 776-792, 2022. DOI 10.5902/1980509849227. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509849227>.