

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Arroz e Feijão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **Documentos 289**

# **Técnica de Produção do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para Uso em Controle Biológico**

*Gabriel Moura Mascarin  
Eliane Dias Quintela*

Embrapa Arroz e Feijão  
Santo Antônio de Goiás, GO  
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Arroz e Feijão**

Rod. GO 462, Km 12  
Caixa Postal 179  
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO  
Fone: (0xx62) 3533 2110  
Fax: (0xx62) 3533 2123  
www.cnpaf.embrapa.br  
cnpaf.sac@embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Roselene de Queiroz Chaves*  
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*  
Membros: *Ana Lúcia Delalibera de Faria*  
*Flávia Aparecida de Alcântara*  
*Heloísa Célis Breseghello*  
*Fábio Fernandes Nolêto*  
*Luís Fernando Stone*  
*Márcia Gonzaga de Castro Oliveira*  
*Camilla Souza de Oliveira*

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*  
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*  
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*  
Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*  
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

**1ª edição**

Versão online (2013)

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Arroz e Feijão**

---

Mascarin, Gabriel Moura.

Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico / Gabriel Moura Mascarin, Eliane Dias Quintela. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2013.

17 p. – (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 289)

1. Fungo entomopatogênico – controle biológico. 2. Micopesticida. I. Quintela, Eliane Dias. II. Título. III. Embrapa Arroz e Feijão. IV. Série.

---

CDD 632.96 (21. ed.)

© Embrapa 2013

# **Autores**

## **Gabriel Moura Mascarin**

Engenheiro agrônomo, Mestre em Entomologia,  
analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio  
de Goiás, GO, gabriel.mascarin@embrapa.br

## **Eliane Dias Quintela**

Engenheira agrônoma, Ph.D. em Entomologia,  
pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo  
Antônio de Goiás, GO, eliane.quintela@embrapa.br



# Apresentação

No atual cenário do agronegócio brasileiro, o crescimento da agricultura orgânica aliado às exigências de alimentos isentos de agrotóxicos por parte do mercado consumidor interno e externo vêm propulsionando o avanço e desenvolvimento de produtos biológicos para controle de pragas agrícolas. Entre os agentes de biocontrole mais utilizados no mundo, os fungos entomopatogênicos exercem um importante papel em programas de manejo integrado de pragas. Esses fungos benéficos são encontrados naturalmente infectando e causando doenças em níveis epizooticos (grande número de insetos infectados) em populações de artrópodes.

Dessa forma, uma maneira de incrementar ou aplicar esses micopesticidas, como assim também são chamados, consiste em produzi-los em meios artificiais.

No Brasil, por exemplo, o fungo mais estudado e produzido em escala comercial é o *Metarhizium anisopliae sensu lato*, cujo uso já atingiu mais de um milhão de hectares tratados. Inúmeros trabalhos continuam sendo conduzidos em condições de laboratório e campo com este fungo, principalmente em virtude da sua ampla variabilidade genética, grande variedade de hospedeiros e facilidade de produção usando substratos artificiais. Para que este microrganismo seja utilizado em pesquisas ou mesmo em escala comercial, torna-se

importante desenvolver métodos eficientes de produção. No Brasil, este fungo é produzido basicamente por um processo conhecido como fermentação sólida-estática. Neste caso, objetiva-se produzir os propágulos infectivos do fungo, denominado conídios, mediante o uso de substratos sólidos à base de cereais, os quais fornecem condições nutricionais e físicas necessárias ao crescimento do microrganismo. O conhecimento desse processo de produção do fungo *M. anisopliae* se torna útil e importante para aqueles envolvidos na área de controle microbiano aplicado.

Neste contexto, o presente trabalho tem o objetivo de divulgar de forma simples e básica um protocolo de fermentação sólida-estática em pequena escala, usando como substrato o arroz parboilizado, para produção de conídios de *M. anisopliae* visando ao uso em pesquisas de controle microbiano em laboratório ou campo. Vale ressaltar que esta metodologia é aplicável a vários outros fungos entomopatogênicos anamórficos não listados aqui, mas que também apresentam potencial de controle biológico de pragas. Este trabalho, dada a sua abordagem simples e prática, destina-se a todos os interessados em produzir e usar fungos entomopatogênicos em pesquisas de controle biológico.

*Os autores*

# Sumário

<b>Introdução</b> .....	<b>9</b>
<b>Desenvolvimento metodológico</b> .....	<b>11</b>
Inóculo inicial .....	11
Produção do fungo em arroz .....	11
Secagem em estufa elétrica.....	13
Extração dos confídios secos.....	14
Secagem final e armazenamento .....	14
Lista de materiais e equipamentos utilizados.....	16
<b>Referências</b> .....	<b>16</b>



# Técnica de Produção do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para Uso em Controle Biológico

---

*Gabriel Moura Mascarin*  
*Eliane Dias Quintela*

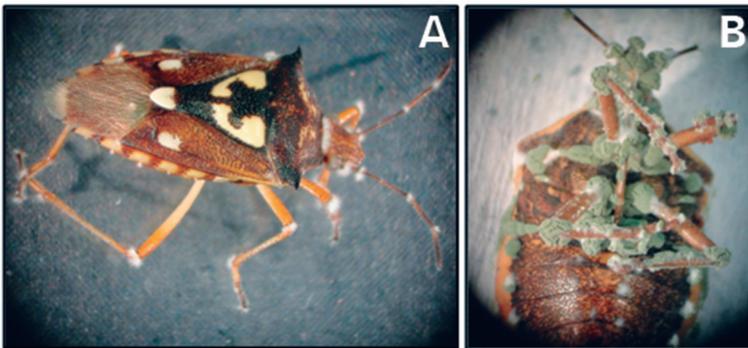
## Introdução

Os fungos entomopatogênicos são agentes causais de doenças de inúmeros artrópodes e apresentam uma grande importância na regulação natural de populações de insetos e ácaros pragas (MASCARIN; PAULI, 2010). Os fungos mais utilizados no mundo para controle de pragas são *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.), *Beauveria bassiana* s.l., e em menor escala encontram-se os fungos *Lecanicillium muscarium*, *L. longisporum* e *Isaria fumosorosea*, sendo que todos pertencem ao grupo Hypocreales e cujo ciclo de vida mais explorado é o anamórfico, anteriormente também denominados de hifomicetos ou fungos mitospóricos (FARIA; WRIGHT, 2007). Esses fungos agem por contato sobre seus hospedeiros, logo precisam ser aplicados diretamente sobre o alvo e/ou o hospedeiro entrar em contato com o inóculo, para que se inicie o processo de infecção.

No Brasil, o fungo entomopatogênico mais produzido e utilizado é *M. anisopliae* s.l., principalmente em virtude dos programas de controle biológico das cigarrinhas das pastagens e da cana-de-açúcar, com mais de 1 milhão de hectares em área aplicada (MICHEREFF FILHO et al., 2009; LI et al., 2010). O emprego desses fungos na agricultura é crescente, principalmente em virtude da expansão da agricultura orgânica e aumento da demanda por alimentos isentos de resíduos de

agrotóxicos. Sendo assim, esses agentes de controle biológico são ferramentas importantes em programas de manejo integrado de pragas no atual cenário agrícola.

A linhagem CG168 de *M. anisopliae* foi originalmente isolada de adultos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae) mortos e esporulados pelo fungo durante uma epizootia em casa de vegetação na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO. Esta linhagem é objeto de estudo na Embrapa Arroz e Feijão desde 1980 e, com base nos resultados obtidos, tem se mostrado muito eficiente no controle de percevejos fitófagos do arroz, como *T. limbativentris* e *Oebalus* spp. (Figura 1 A e B). Estudos recentes vêm demonstrando o potencial desta linhagem fúngica no manejo integrado do percevejo-do-colmo do arroz (*T. limbativentris*) em condições de campo (MARTINS et al., 2004; QUINTELA et al., 2013). Para que este fungo possa ser aplicado em larga escala, é necessário dominar a técnica de produção de conídios, os quais são geralmente produzidos via fermentação sólida-estática monofásica ou bifásica (MASCARIN et al., 2010). Portanto, neste documento será abordada a técnica de fermentação sólida-estática monofásica para produção de conídios aéreos hidrofóbicos da linhagem CG168 de *M. anisopliae*, usando como substrato o arroz parboilizado, que apresenta características físicas e nutricionais favoráveis à multiplicação deste entomopatógeno.



**Figura 1.** Pentatomídeos fitófagos do arroz. *Oebalus poecilus*(A) e *Tibraca limbativentris*(B) colonizados pela linhagem CG168 de *M. anisopliae*.

## Desenvolvimento metodológico

### Inóculo inicial

A linhagem CG168 de *M. anisopliae* está armazenada na Coleção de Fungos de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF. O fungo se encontra preservado na forma de conídios aéreos em tubos de 2 mL do tipo eppendorf® após ter sido desidratado (liofilizado) e criopreservado em nitrogênio líquido. Sub-amostras desse material são também mantidas na Embrapa Arroz e Feijão sob ultracongelamento ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), misturados a uma solução de 10% de glicerol, a fim de evitar danos às membranas celulares. É a partir desses conídios em armazenamento que se inicia a produção do inóculo inicial do fungo. Os conídios são produzidos em meio comercial de batata-dextrose-água (BDA) em placas de Petri ( $9,0 \times 1,5\text{ cm}$ ) durante 10–12 dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D. à temperatura de  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ , UR > 60% e com 12 horas de fotofase (Figura 2).



**Figura 2.** Colônia de *M. anisopliae* CG168 em placa de Petri contendo meio BDA após 10 dias de incubação a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 12 h de fotofase.

### Produção do fungo em arroz

Para um kg de arroz parboilizado, adicionam-se 2 L de água deionizada para embeber os grãos por um período de 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, o excedente de água é retirado e o arroz úmido é transferido para um saco plástico de polipropileno ( $39,5 \times 25,0\text{ cm}$ ), preenchendo cerca de 1/3 do volume total (300 g). A abertura do saco

plástico é dobrada duas vezes e grampeada. Os sacos contendo arroz são levados para autoclave e esterilizados por 25 minutos a 120 °C (1 atm). Após a autoclavagem, os sacos são retirados e espalhados sobre uma mesa limpa onde ficam por cerca de 1 hora para resfriarem à temperatura ambiente. Finalmente, o arroz está pronto para ser inoculado com a suspensão de conídios do fungo.

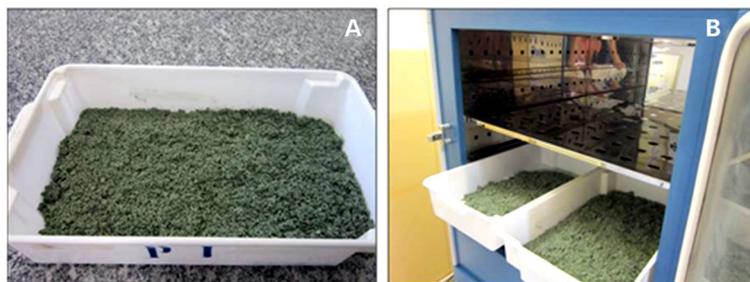
Uma suspensão de conídios da linhagem CG168 é preparada com solução estéril de Tween 80 a 0,05% mediante raspagem dos conídios com espátula. Em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas, o fungo é inoculado em 300 g de arroz pré-cozido na proporção de  $5 \times 10^6$  conídios/g de arroz, ou seja, inoculam-se 10 mL de uma suspensão conidial com cerca de  $1,5 \times 10^8$  conídios/mL. Esta inoculação pode ser feita com uma seringa veterinária através de um orifício no saco plástico, evitando assim problemas com contaminações. Os sacos são grampeados novamente e agitados vigorosamente para homogeneizar os conídios por toda a massa de arroz. Finalmente, os sacos são levados para uma câmara climatizada ajustada para 26 °C com 12 h de fotofase por um período de 7–8 dias, quando finalmente obtém-se o máximo desenvolvimento e esporulação do fungo no arroz (Figura 3). Para a produção em larga escala (industrial), o ideal seria incubar os sacos com arroz + fungo em sala climatizada com controle da temperatura entre 25–30 °C. Para melhorar a aeração dentro dos sacos plásticos, já que esses fungos são aeróbicos e demandam muito oxigênio, é importante que sejam feitos no mínimo 50 orifícios com auxílio de agulha hipodérmica (após 4 dias da inoculação) em uma das faces do saco plástico, o qual deverá ser disposto na horizontal em câmara ou sala climatizada. Se o material ficar em fermentação por tempo superior a essa fase de incubação (7-8 dias), a viabilidade dos conídios poderá ser comprometida, pois sofrem estímulo para germinar em razão da alta umidade estabelecida no interior da embalagem plástica. Portanto, deve-se evitar um longo tempo de incubação para extração dos conídios. Neste momento, os sacos plásticos devem ser abertos e o arroz + fungo distribuído cuidadosamente em bandejas plásticas deixando-se uma camada de 1–2 cm ( $\approx$  600-900 g de arroz + fungo). Finalmente, as bandejas são levadas para uma estufa de secagem com circulação forçada de ar.



**Figura 3.** Sacos plásticos de polipropileno com arroz parboilizado colonizado por *M. anisopliae* CG168 após 7 dias de incubação a 26 °C com 12 h de fotofase.

### Secagem em estufa elétrica

A secagem é realizada em estufa elétrica com controle de temperatura e circulação forçada de ar. A temperatura é ajustada para  $28 \pm 2$  °C e o arroz + fungo distribuído em bandejas plásticas (30 × 48 × 9 cm) (podem ser usadas bandejas metálicas de aço inoxidável) (Figura 4A). Em seguida, as bandejas são levadas para a estufa, onde permanecem por mais 2–3 dias (Figura 4B).



**Figura 4.** Distribuição do arroz + fungo em bandeja plástica (camada de 1–2 cm) (A) e secagem do material em estufa elétrica com circulação forçada de ar (B) por 2–3 dias a 28 °C.

Decorrido o processo de secagem, retiram-se três amostras de 10 g de arroz + fungo as quais são transferidas para estufa a 80 °C por 48 h até atingirem peso constante, quando então determina-se a umidade do lote produzido. A umidade dos conídios no arroz após secagem é expressa pela fórmula a seguir: % Umidade =  $[(Mu - Ms) / Mu] \times 100$ , onde  $Mu$  é a massa úmida antes da secagem e  $Ms$  é a massa seca

após secagem. Dessa forma, tem-se a porcentagem de umidade com base no peso seco da amostra.

### Extração dos conídios secos

Após a secagem em estufa, os conídios são extraídos do arroz por meio de um jogo de peneiras vibratórias ou, em menor escala, utilizando um sistema mais simples à base de cano de PVC com tecido “voile” acoplado a um saco plástico na lateral para coleta dos conídios (Figura 5). Ao final do processo, o rendimento da linhagem CG168 pode atingir até  $9,7 \times 10^{10}$  conídios/g de conídios secos (< 12% umidade) com mais de 90% de viabilidade. Esse resultado é satisfatório para produzir esta linhagem em larga escala.

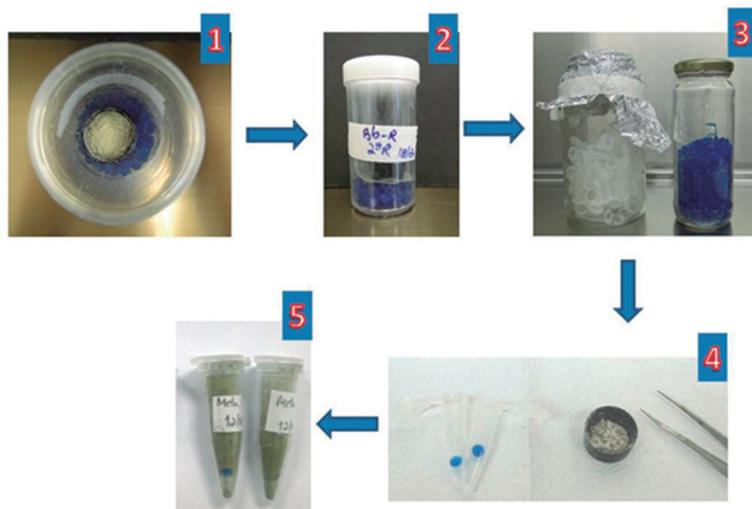


**Figura 5.** Peneira manual feita com cano PVC para extração de conídios produzidos em arroz em pequena escala.

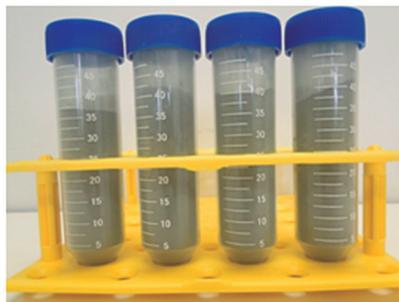
### Secagem final e armazenamento

Os conídios são novamente secos em um dessecador feito com recipiente de acrílico ( $8 \times 2,5$  cm) contendo cerca de 10 g de sílica gel no fundo e fechado com tampa hermética (Figura 6). Os conídios, extraídos anteriormente, são colocados num vidro relógio ou tampa plástica e, em seguida, transferidos para dentro de um dessecador onde permanecem de 2–3 dias a  $26^\circ\text{C}$  para secagem até a umidade atingir 2–3%. Decorrido este período, os conídios

são transferidos para tubos eppendorf® de 2mL contendo um grânulo de sílica gel para manter o material desidratado. Este material pode ser acondicionado em freezer a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou geladeira a  $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período de até 1 ano ou mais (Figura 7). A sobrevivência desse propágulo ao longo do tempo pode ser verificada com base na determinação da sua viabilidade (capacidade de germinação) mediante inoculação de uma amostra de conídios em meio BDA e avaliação dos conídios germinados após 18 h de incubação a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O cálculo da % germinação é dado pela seguinte fórmula: % Germinação =  $[a / (a + b)] \times 100$ , em que: a = conídios germinados com tubo germinativo do mesmo comprimento ou maior que o conídio (viáveis); b = conídios não germinados (inviáveis). Em geral, o fungo deve apresentar uma germinação  $\geq 85\%$  para uso como micoinseticida em experimentos.



**Figura 6.** Secagem de conídios aéreos extraídos de arroz ou meio de cultura BDA em recipiente hermético com sílica gel. 1) Tampa plástica contendo conídios do fungo e colocada dentro de um frasco de acrílico sobre uma camada de sílica (10 g) e fechada hermeticamente; 2) Detalhe do dessecador; 3) Tubos eppendorf® e sílica gel em grânulos; 4) Após secagem por 2–3 dias ( $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), conídios são colocados em tubos eppendorf® contendo um grânulo de sílica gel no fundo; 5) Detalhe dos tubos eppendorf® preenchidos com conídios de *M. anisopliae*.



**Figura 7.** Conídios de *M. anisopliae* linhagem CG168, após extração e secagem, acondicionados em frascos herméticos prontos para serem preservados em geladeira ou freezer. Conídios contendo menos de 5% de umidade aumenta a durabilidade do lote.

## Lista de materiais e equipamentos utilizados

Alça de platina

Autoclave

Bandeja plástica (30 × 48 × 9 cm)

Estufa com circulação de ar

Meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar)

Micropipetas de 1 mL e 10 mL

Câmara de fluxo laminar

Peneirador feito de tubo PVC

Placas de Petri (9 × 1,5 cm) de vidro ou de poliestireno descartável

Potes de acrílico (7,7 × 3,8 cm)

Sacos plásticos de polipropileno (39,5 × 25 cm)

Sílica gel em grânulos

Solução Tween 80 a 0,05% estéril

Tecido “voile”

Tubos Falcon® de 45 mL

## Referências

FARIA, M. R. de; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, n. 3, p. 237–256, Dec. 2007.

LI, Z.; ALVES, S. B.; ROBERTS, D. W.; FAN, M.; DELALIBERA JUNIOR, I.; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 117–136, 2010.

MARTINS, J. F. da S.; BOTTON, M.; CARBONARI, J. J.; QUINTELA, E. D. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1681-1688, nov./dez. 2004.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Coord.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa, MG: Epamig, 2010. v. 4, p. 169–195.

MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p. 753–761, July/Aug. 2010.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após 4 décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 769–779, out./dez. 2009.

QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; SILVA, R. A. da; BARRIGOSI, J. A. F.; MARTINS, J. F. da S. Enhanced susceptibility of *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) to *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of chemical insecticides. **Biological Control**, Orlando, v. 66, n. 1, p. 56–64, Jul. 2013.

