

**Identificação e controle de fungos
entomopatogênicos presentes em uma coleção
entomológica**

*Identification and control of entomopathogenic fungus
present in an entomological collection*

GILDEMAR DANTAS MEDEIROS¹

FRANCILINA ARAÚJO COSTA²

ANTONIA RAILDA ROEL³

REGILENE FÁTIMA OLIVEIRA⁴

ELAINE APARECIDA CARVALHO ANJOS-AQUINO⁵

¹ Acadêmico de Biologia e Iniciação Científica (Pibic/CNPq – UCDB).
gildemar2007@yahoo.com.br.

² Doutora em Microbiologia Agrícola, Professora da Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande, MS.

³ Doutora em Entomologia, Professora da Universidade Católica Dom
Bosco, Campo Grande, MS.

⁴ Bióloga, formada pela Universidade Católica Dom Bosco,
Campo Grande, MS.

⁴ Mestre em Ecologia e Conservação, Professora da Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande, MS.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi identificar fungos entomopatogênicos presentes em uma coleção entomológica e testar alguns antifúngicos para o controle dos mesmos. Foram feitas coletas de estruturas fúngicas, colocadas para crescer em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) a 28°C e posteriormente identificados como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Após o isolamento, foram testados produtos para o controle fúngico (formol, óleo de nim, gasolina e querosene) em diferentes concentrações. Foram feitas 5 repetições para cada concentração utilizada e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1%. Houve um comportamento diferenciado de respostas aos produtos testados nos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. O formol apresentou-se como melhor antifúngico para reduzir o crescimento dos fungos testados e o óleo de nim foi eficiente nas menores concentrações. No entanto, a gasolina e o querosene não foram considerados eficientes agentes antifúngicos para controle de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

PALAVRAS-CHAVE

fungos entomopatogênicos
insetos
coleções entomológicas

ABSTRACT

The aim of this work is identify entomopathogenic fungi present in an entomology collection and test some antifungals for their control. Fungal structures were collected, and put to grow in culture media PDA (Potato Dextrose Agar) to 28°C and after identified as Aspergillus sp. and Penicillium sp. After the isolation, products were tested in different concentrations for the fungical control (formol, nim oil, gasoline, kerosen). Aliquots 100il of each product from the different concentrations were added in 20ml of culture media BDA soluble, and right after that, poured in a petri dish. After the solidification of the media it was put on the center of a disc with 1cm of diameter of mycelium of the isolated fungus Aspergillus sp or Penicillium sp. On the 12th day the diameter of the fungical colony formed in each concentration was measured. Five repetitions were done for each concentration used and the averages compared by the Tukey test at 1%. There was a distinguished behavior of replies to the tested products in the fungi Aspergillus sp. and Penicillium sp. The formol was shown to be the best antifungal to reduce the growing of the tested fungi and the nim oil was efficient in smaller concentration. However the gasoline and the kerosene were not considered efficient antifungal agents for the control of Aspergillus sp. and Penicillium sp.

KEY WORDS

*entomopathogenic fungus
insects
entomological collections*

INTRODUÇÃO

Os insetos constituem o maior e mais diverso grupo de animais da terra, com 1 milhão de espécies identificadas. Segundo alguns especialistas, esse número pode representar mais de 20% da espécies ainda a serem descobertas (BESTI-FILHO, 1990).

As coleções zoológicas de museus e laboratórios têm um importante papel como material didático, na utilização e geração de conhecimento, e ainda contribuem para a capacitação de pessoal. Além disso, as coleções científicas servem como documento sobre a biodiversidade e podem ser estudadas por futuras gerações de pesquisadores, uma vez que as identificações de espécies são necessárias para interpretação dos resultados de um estudo ecológico. No entanto, ainda existem alguns problemas a serem enfrentadas para conservação e preservação das coleções zoológicas, dentre elas, a colonização dos insetos por fungos entomopatogênicos que destroem e danificam as coleções com o passar do tempo.

Existem vários relatos sobre fungos entomopatogênicos que atacam insetos na agricultura. Os considerados mais importantes para o controle biológico de pragas são pertencentes aos gêneros *Metarhizium*, *Beuveria*, *Normuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (ALVES, 1986; ALMEIDA; ATHAYDE et al. 2001; BATISTA FILHO, 2001; FARIA; MAGALHÃES, 2001). Diversas espécies de fungos são responsáveis por cerca de 80% das doenças causadas em insetos. Estima-se que no Brasil os fungos entomopatogênicos estejam distribuídos em mais de 750 espécies reunidas em 85 gêneros (ALVES, 1986). As doenças causadas por fungos devem-se à dispersão; viabilidade; concentração de esporos e virulência do patógeno; a densidade populacional e susceptibilidade do hospedeiro ao fungo e a fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz (REIS, 1991).

A espécie de fungo entomopatogênico de maior relevância para Brasil é o *Metarhizium anisopliae*, produzida em larga escala para o controle de cercopídeos em pastagens e cana-de-açúcar (ALVES, 1986). *Metarhizium anisopliae* ocorre naturalmente em, mais de 300 espécies de insetos. Outro fungo de grande importância pertence ao gênero *Beuveria* e pode causar doenças em mais de 200 espécies de insetos entre Coleoptera, Hemiptera e Homoptera

(REIS, 1991). A terceira espécie em grande importância é o *Nomuraea rileyi*, que ataca mais de 32 espécies de insetos, entre Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera, sendo 90% dos hospedeiros Lepidoptera. Outras espécies de fungos entomopatogênicos incluem *Verticillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii* (ALVES, 1986).

Na literatura não existe relatos de fungos entomopatogênicos que danificam coleções entomológicas de museus e laboratórios, e de produtos que possam ser aplicados em insetos para prevenir contaminações e danificação destes pelos fungos.

Extratos vegetais vêm sendo utilizados como uma alternativa para o controle do crescimento fúngico, o que possibilita uma redução dos produtos químicos atualmente usados para combater fungos. Esses extratos são utilizados para o combate de fungos fitopatogênicos, que ocorrem em regiões onde se produz frutas e grãos. Existem relatos de que o óleo de nim afetou o crescimento, a esporulação e a variabilidade de fungos entomopatogênicos *Beuveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Paecilomyces farinosus* (Hom ex SF Gray), Brown e Smith (apud MARQUES et al., 2004), sendo *M. anisopliae* menos sensível que os demais fungos.

O objetivo deste trabalho foi identificar fungos entomopatogênicos presentes nas coleções entomológicas do laboratório de Invertebrados da UCDB, e testar alguns antifúngicos para o controle e prevenção desses patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

1.1 ISOLAMENTOS DOS FUNGOS

O experimento foi realizado nos laboratórios de Invertebrados e de Microbiologia da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campus Campo Grande-MS. Para o experimento, foi utilizada a coleção de insetos do laboratório de Invertebrados da UCDB, que está sob responsabilidade da professora Antônia Railda Roel.

Para obtenção dos isolados fúngicos, os insetos contaminados pertencentes as famílias Apidae, Cerambycidae, Belostomatidae foram

inicialmente observados em uma lupa de 50x, sendo posteriormente identificados e fotografados. Para o isolamento dos fungos coletou-se com agulha entomológica estruturas fúngicas (esporos e micélios) sob a região do corpo do inseto contaminado. Em seguida, estas estruturas foram colocadas para crescer em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) em placas de Petri a 28° C. Lâminas microscópicas foram preparadas com as estruturas fúngicas utilizando-se o corante lactofenol azul de algodão para identificação dos fungos.

1.2 EFEITOS DE DIFERENTES PRODUTOS SOB O CRESCIMENTO DOS FUNGOS *PENICILLIUM SP* E *ASPERGILLUS SP*

Para inibir o crescimento foram utilizados quatro produtos antifúngicos (formol, óleo de nim, querosene e gasolina) nas seguintes concentrações: formol (0%, 4%, 9%, 18%, 27%, 37%), óleo de nim, gasolina e querosene (0%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100%). Como controle, foi utilizado meio de BDA puro. Os diluentes utilizados para o óleo de nim (gasolina, querosene e formol) foram respectivamente álcool isoamínico, álcool 92,8% e água destilada. Alíquotas de 100µl de cada produto separadamente nas diferentes concentrações, foram adicionadas em 20 ml de meio de cultura BDA fundente e vertidos em placas de Petri. No centro de cada placa, após a solidificação do meio, e colocado um disco de 1 cm de diâmetro de micélio dos fungos *Aspergillus sp.* ou *Penicillium sp.*, previamente crescidos em BDA individualmente por 24 horas. As placas contendo os tratamentos foram incubadas por 12 dias a 30° C. Após esse período foi feita a avaliação medindo-se o diâmetro da colônia formada. Foram feitas 5 repetições para cada concentração de cada produto. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey 1%.

RESULTADOS

Os insetos analisados, que apresentaram fungos entomopatogênicos, pertencem às famílias Apidae, Belostomatidae e Cerambycidae. Nos insetos das família Apidae e Belostomatidae isolou-se o fungo *Aspergillus sp.* enquanto que no inseto da família Cerambycidae isolou-se o *Penicillium sp.* (Figura 1 e Figura 2).

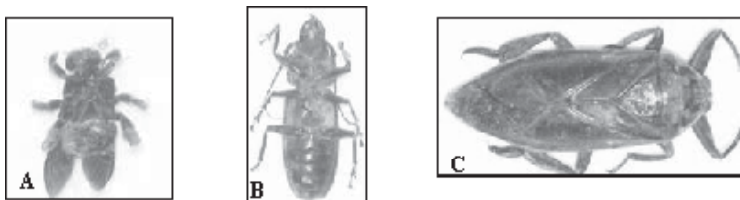


Figura 1: Insetos contaminados com fungos Entomopatogênicos: Apidae (A), Cerambycidae (B), Belostomatidae (C)

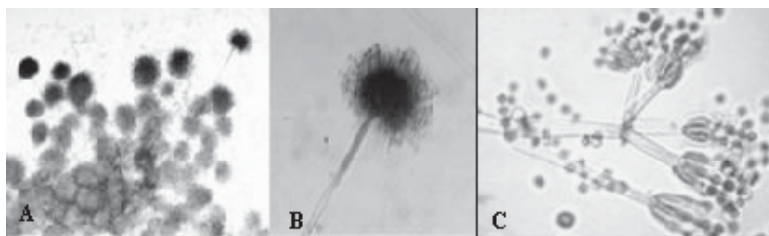


Figura 2: Estruturas fúngicas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados dos insetos. A - Estruturas fúngicas de *Aspergillus* sp. B - Detalhe da estrutura fúngica de *Aspergillus* sp. mostrando vesícula e esporos do fungo. C - Estrutura fúngica de *Penicillium* sp.

De acordo com os resultados obtidos para avaliação dos produtos, observou-se que em relação ao fungo *Penicillium* sp, quando crescido em meio BDA contendo formol, houve uma redução no crescimento em todas as concentrações testadas quando comparados ao controle, havendo menor redução do crescimento na concentração de 4% de formol (Figura 3). Houve efeito significativo do óleo de nim sobre o crescimento fúngico de *Penicillium* sp em todas as concentrações testadas, quando comparado ao controle. No entanto, nas concentrações de 12,5% e 25%, foi observado maior redução do crescimento do fungo *Penicillium* sp (Figuras 3 e 4). Em relação à gasolina, apenas a concentração de 100% reduziu o crescimento deste fungo. A concentração de querosene de 100% reduziu o crescimento fúngico quando comparado ao controle e às concentrações de 12,5 e 25% (Figura 3). O formol, em todas as concentrações testadas para o *Penicillium* sp, provocou uma maior redução no crescimento fúngico quando comparado ao óleo de nim, querosene e gasolina. Nas concentrações de 12,5, 25 e 50% o óleo

de nim foi o que mais reduziu o crescimento fúngico quando comparado a gasolina e querosene nas mesmas concentrações (Figura 3).

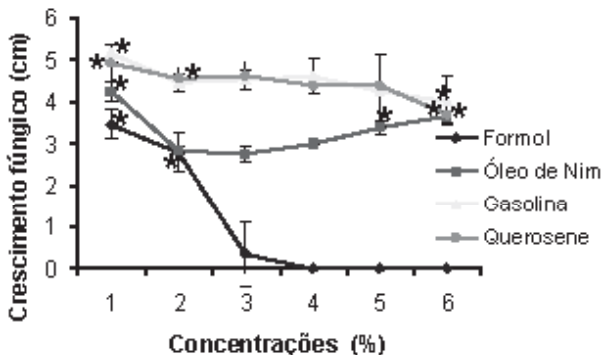


Figura 3: Efeito dos produtos formol, óleo de nim, gasolina e querosene sobre o crescimento do fungo *Penicillium* sp no meio de cultura BDA em diferentes concentrações. Concentrações de formol = 1 (controle), 2 (4%), 3 (9%), 4 (18%), 5 (27%) e 6 (37%). Concentrações de Óleo de nim, Gasolina e Querosene = 1 (controle), 2 (12,5%), 3 (25%), 4 (50%), 5 (75%) e 6 (100%).

* $P < 0,0001$

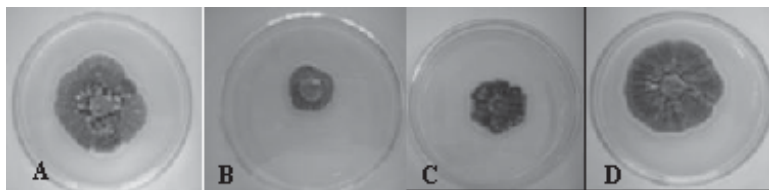


Figura 4: Diâmetro de colônia fúngica de *Penicillium* sp crescida em meio BDA com óleo de nim nas concentrações: 0% (controle) (A), 12,5% (B), 25% (C), 100% (D) com 12 dias de crescimento.

Em relação ao fungo *Aspergillus* sp observou-se que apenas a concentração de 37% de formol no meio de cultura reduziu significativamente o crescimento fúngico (Figura 5). Houve efeito do óleo de nim no crescimento do fungo *Aspergillus* sp (Figuras 5 e 6) nas concentrações de 12,5 e 25%, ou seja, nas menores concentrações utilizadas. A gasolina e o querosene não inibiram o crescimento desse fungo nas diferentes concentrações testadas. Nas concentrações de 12,5 e 25% de óleo de nim obteve-se maior redução no crescimento de *Aspergillus* sp

que os demais produtos utilizados. Nas concentrações de 50% e 75% não houve diferença de crescimento fúngico entre todos os produtos. Para o *Aspergillus* sp a concentração de 37% de formol no meio de cultura provocou uma maior redução do crescimento quando comparado aos demais produtos nesta mesma concentração (Figura 5).

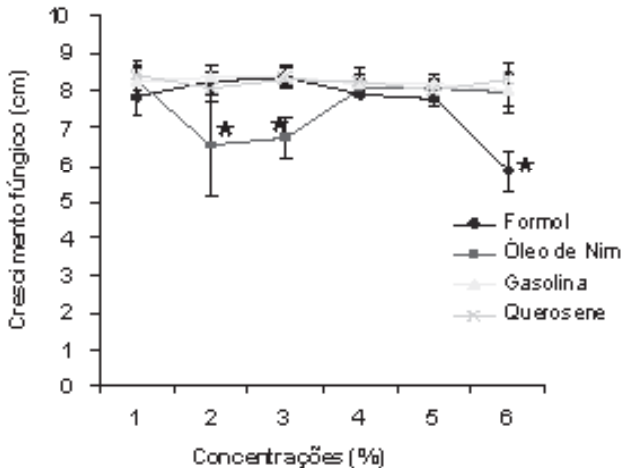


Figura 5: Efeito dos produtos formol, óleo de nim, gasolina e querosene sobre o crescimento do fungo *Aspergillus* sp no meio de cultura BDA em diferentes concentrações. Concentrações de formol = 1 (controle), 2 (4%), 3 (9%), 4 (18%), 5 (27%) e 6 (37%). Concentrações de Óleo de nim, Gasolina e Querosene = 1 (controle), 2 (12,5%), 3 (25%), 4 (50%), 5 (75%) e 6 (100%).

* $P < 0,0001$

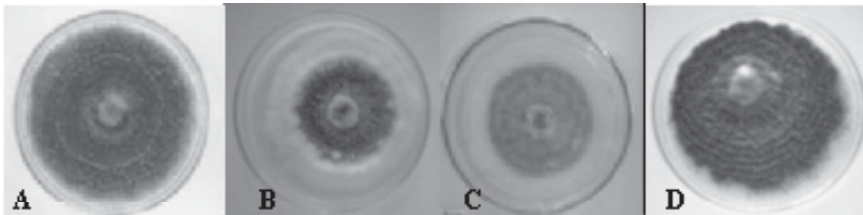


Figura 6: Diâmetro de colônia fúngica de *Aspergillus* sp crescida em meio BDA com óleo de nim nas concentrações: 0% (controle) (A), 12,5%(B), 25%(C), 100%(D) com 12 dias de crescimento.

DISCUSSÃO

Dos produtos utilizados, o formol foi o que mais inibiu o crescimento dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., resultado esperado uma vez que o formol é um eficiente produto antifúngico, sendo, por isso, aplicado como pastilhas para conservação de coleções de insetos em museus e laboratórios. O óleo de nim, quando colocado ao meio de cultura BDA, inibiu o crescimento dos fungos nas menores concentrações de 12,5 e 25%. Isso aconteceu devido, provavelmente a maior solubilização do produto no meio em baixas concentrações, pois a solubilização do produto é dificultada quando muito concentrado.

Em outro trabalho (MARQUES et al., 2004), foi observado à eficiência do óleo de nim em reduzir o crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces farinosus*. Os autores constataram que, numa concentração de 0,0048%, o óleo de nim não inibiu o crescimento fúngico, porém, acima dessa concentração houve diminuição do crescimento, e o fungo *M. anisopliae* não teve crescimento a partir da concentração 0,039%, ou seja, em menores concentrações. Além disso, o fungo *Beauveria bassiana* não apresentou redução no seu crescimento com óleo de nim puro (sem emulsificante); só em concentrações menores a 5% de óleo emulsificado houve uma redução no crescimento (QUINTELA et al., 2001).

Esses dados concordam com os resultados apresentados neste trabalho, isto é, em menores concentrações de óleo de nim foi encontrado maior crescimento dos fungos testados. De acordo com os resultados, o óleo de nim tem potencial para ser utilizado no controle do crescimento dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. O querosene e a gasolina não promoveram redução no crescimento, exceto no caso do querosene em concentração de 100% que inibiu o crescimento do *Penicillium* sp. Assim, não são considerados, eficientes agentes antifúngicos para controle de fungos que colonizam coleções entomológicas. Novos extratos vegetais devem ser testados para verificar seu potencial em controlar crescimento de fungos entomopatogênicos.

CONCLUSÃO

Houve um comportamento diferenciado de respostas aos produtos testados nos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. O formol apresentou-se como melhor antifúngico para reduzir o crescimento dos fungos testados. O óleo de nim foi eficiente em reduzir o crescimento nas menores concentrações de 12,5 e 25%, tendo potencial para ser utilizado no controle do crescimento dos fungos testados. A gasolina e o querosene não foram considerados eficientes agentes antifúngicos para controle dos fungos *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. *Biotecnol. Ciência & Desenvolvimento*, n. 20, p. 30-33, 2001.
- ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed). *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo: Manole, 1986. 407 p.
- ATHAYDE, A.C.R.; FERREIRA U.L. LIMA E.A.L. A, Fungos Entomopatogênicos uma alternativa para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus*. *Biociência Ciência & Desenvolvimento*, [S.l.] n.21, jul/ago. 2001.
- BESTI-FILHO, E. O controle biológico dos insetos-pragas. In: Crocomo W.B. (Org.). *Manejo Integrado de Pragas*. São Paulo: UNESP, 1990. p. 87-104.
- FARIA, M.R, MAGALHÃES, B.P O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectiva. *Biociência Ciência & Desenvolvimento*, [S.l.] n. 22, (set-out) 2001.
- MARQUES, R.P et al. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 6, p.1675-80, nov-dez. 2004.
- QUINTELA, E.D. et al. Controle de pragas do feijoeiro com nim indiano e outras plantas. In: BOIÇA JR, A.L. et al. *V Curso sobre produção e utilização do Nim (Azadirachia indica) na agropecuária*. Jaboticabal: Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, 2001. p.1-10.
- REIS, E.M. Solos supressivos e seu aproveitamento no controle de doenças de planta . In: BETTIOL, W. (Ed). *Controle Biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 181-193