

PRODUÇÃO DE ISOLADOS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*, SELECIONADOS PARA O CONTROLE DE *MAHANARVA FIMBRIOLATA* (STAL, 1854)

E. de S. Loureiro¹, A. Batista Filho², J.E.M. de Almeida², L.G.A. Pessoa³

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Ciências Biológicas, CP 533, CEP 79804-970, Dourados, MS, Brasil. E-mail: lis_loureiro@yahoo.com.br

RESUMO

A produção em grande escala de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin é feita predominantemente em meio de cultura sólido, utilizando-se grãos de arroz como substrato. Com o objetivo de determinar a produção e a viabilidade de diferentes isolados desse fungo, foi colocado em sacos de polipropileno medindo 35 cm de comprimento e 22 cm de largura, contendo 100 g de arroz pré-cozido e imediatamente autoclavado a 120° C, por 25 min. Após o resfriamento do arroz, inoculou-se 1 mL de uma suspensão contendo 5×10^7 conídios/mL, sendo levados para a sala de incubação à temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C e fotofase de 12h. Os sacos plásticos contendo arroz + fungo foram incubados por 10 dias. Decorrido esse período, o arroz + fungo foi acondicionando em bandejas plásticas para promover a conidiogênese do fungo a temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C, $80 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12h. As bandejas ficaram empilhadas por 4 dias, cruzando-as por mais 4 dias. Os isolados IBCB 348; IBCB 408; IBCB 410 e IBCB 425 foram os que mais produziram conídios em arroz com $2,08 \times 10^8$, $1,75 \times 10^8$, $2,22 \times 10^8$ e $2,30 \times 10^8$ conídios/g de arroz pré-cozido, respectivamente, pelo método de bandeja.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, fungos entomopatogênicos, controle microbiano.

ABSTRACT

PRODUCTION OF ISOLATES OF *METARHIZIUM ANISOPLIAE*, SELECTED FOR THE CONTROL OF *MAHANARVA FIMBRIOLATA* (STAL, 1854). The production in large scale of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin is done predominantly in solid culture media, using rice grains as substratum. With the goal of determining the production and the viability of different isolates of this fungi, it was placed in polypropylene bags measuring 35 length cm and 22 width cm, containing 100 g of precook rice and immediately sterilized to 120° C, for 30 minutes. After the cooling of the rice, it was inoculated with 1mL of a suspension contening 5.0×10^7 conidia/mL, and carried to the incubation room at the temperature of 25 ± 1 C and 12-hour photophase. The plastic bags contening rice+fungus were incubated for 10 days. After, the rice + fungus was placed in plastic trays to promote conidiogenesis of the fungus, at $25 \pm 1^\circ$ C, $80 \pm 10\%$ of RH and 12-hour photophase. The trays were heaped for 4 days, crossing them for 4 more days. The isolates IBCB 348; IBCB 408; IBCB 410 and IBCB 425 produced the most conidia with 2.08×10^8 , 1.75×10^8 , 2.22×10^8 and 2.30×10^8 conidia/g of precooked rice, respectively, by the tray method.

KEY WORDS: Insecta, enthomopathogenic fungus, microbial control.

INTRODUÇÃO

O principal dano que *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) causa nos canaviais é a "queima da cana" devido a inoculação de toxinas, uma consequência direta do ataque nas folhas, e se manifesta poucos dias depois da alimentação efetuada pelos adultos. Os adultos, ao injetarem toxinas,

produzem pequenas manchas amarelas longitudinalmente em torno dos pontos picados nas folhas. Com o passar do tempo, tornam-se avermelhadas e, finalmente, opacas reduzindo sensivelmente a capacidade de fotossíntese das folhas e o conteúdo de sacarose do colmo. As manchas amareladas são numerosas e geralmente muito extensas em cada folha, começando pelas mais velhas para as mais

²Instituto Biológico, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil.

³UNIVAG, Várzea Grande, MT, Brasil.

novas, chegando a atingir toda a planta (GUAGLIUMI, 1972).

Os fungos pertencentes à classe-forma Hyphomycetes possuem quase todas as características desejáveis para um patógeno ser efetivo como produto comercial, fato este que tem despertado grande interesse no seu estudo. Entre as características pode-se destacar a facilidade de produção e aplicação, especificidade e a ausência de toxicidade, além de permitir a associação destes organismos com outras táticas de controle, viabilizando sua utilização em grandes áreas (ALVES, 1998). A maioria dos fungos atua por contato e por ingestão, sendo que a sua grande variabilidade genética permite estudos de seleção de cêpas ou isolados e avaliação dos mais virulentos para o controle de pragas (LEITE *et al.*, 2003).

Antes de 1989 a produção em grande escala de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (classe-forma Hyphomycetes) era feita, predominantemente, utilizando garrafas de soro ou pequenos sacos plásticos e grãos de arroz como substrato. Um novo sistema foi desenvolvido por ALVES & PEREIRA (1989) cujo processo é composto de duas fases. A primeira fase é dedicada ao crescimento vegetativo do fungo sobre os grãos em sacos plásticos e a segunda, visando a esporulação é efetuada em bandejas. O ciclo de produção é de 12 a 15 dias, e o rendimento é em torno de 9% de conídios em relação ao peso de grãos crus (ALVES & PEREIRA, 1998). Essa metodologia tem sido utilizada para a produção de *M. anisopliae* por algumas biofábricas e usinas de açúcar e álcool no Brasil.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a produção e a viabilidade do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com vistas ao controle de *M. fimbriolata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção em arroz pré-cozido - Os isolados IBCB 348, IBCB 351, IBCB 363, IBCB 408, IBCB 410, IBCB 418, IBCB 425 e IBCB 482 foram repicados em placas de Petri contendo meio MC. As placas foram incubadas durante dez dias em câmara climatizada BOD ($25 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotofase de 12h) para promover o crescimento e esporulação do fungo. Após 10 dias, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça metálica e então preparada uma suspensão contendo 5×10^7 conídios/mL com água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%.

Inicialmente, foi realizado o cozimento do arroz em água fervendo, por cerca de 15 minutos, até que este apresentasse a textura "emborrachada". Foi escorrida a água, colocando o arroz em bandejas. Após o resfriamento foi colocado 100 g de arroz para cada saco de plástico de polipropileno (35 cm de comprimento x 22 cm de largura). Esses sacos foram fechados

com grampos de metal, autoclavados por 25 min a 120°C , e resfriados em condição ambiente.

Para cada isolado de *M. anisopliae*, foram inoculados 8 sacos com 1 mL de uma suspensão contendo $5,0 \times 10^7$ conídios/mL. A inoculação foi feita com o auxílio de uma seringa descartável, fechado-se em seguida o orifício com uma etiqueta adesiva e agitando-se o recipiente para uma distribuição uniforme do inóculo. Após a inoculação, os sacos foram acondicionados, por 10 dias, em sala climatizada ($25 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotofase de 12h) para a germinação dos conídios e crescimento do fungo. Decorrido este período, foram selecionados, para cada isolado, seis sacos com crescimento uniforme de micélio, os quais tiveram seus conteúdos transferidos, individualmente para bandeja plástica (ALVES & PEREIRA, 1989). As bandejas foram mantidas empilhadas em sala asséptica a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ U.R. e fotofase de 12h, por 8 dias. Depois de quatro dias cruzaram-se as bandejas empilhando-as, permitindo assim uma circulação de ar entre elas, consequentemente uma secagem mais rápida do arroz com fungo.

Para se verificar a concentração e da viabilidade dos conídios foram retirados, ao acaso, duas amostras de 1 g de arroz com fungo de cada bandeja, adicionando-se a ela 10 mL de água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%, para a preparação de uma suspensão de conídios. A suspensão foi diluída e quantificada em câmara de Neubauer. Para a leitura da viabilidade, foram preparadas quatro placas de Petri contendo meio de cultura BDA, inoculadas com o fungo. As placas foram incubadas por 20h a 26°C e 12h de fotofase. Foram quantificados os números de conídios germinados e não germinados, dos quadrantes, em microscópio óptico com objetiva de 400x (ALVES *et al.*, 1998).

Os valores de produção e da viabilidade dos conídios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados dos valores de produção foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados IBCB 348, IBCB 408, IBCB 410 e IBCB 425 foram os mais produtivos, não diferindo estatisticamente entre si, com rendimentos de $2,08 \times 10^8$; $1,75 \times 10^8$; $2,22 \times 10^8$ e $2,30 \times 10^8$ conídios/grama de arroz, respectivamente. Estes isolados, exceto IBCB 408, diferiram estatisticamente dos isolados IBCB 418; IBCB 351; IBCB 363 e IBCB 482 (Tabela 1).

ALVES & PEREIRA (1989) utilizando o mesmo processo, em condições industriais, obtiveram um rendimento em conídios, variando de 6,0 a 11,0% em relação ao arroz utilizado, com produção de $8,8 \times 10^8$ conídios/g.

Esta produção foi cerca de 4 vezes superior quando comparada à produção dos isolados IBCB 425; IBCB 410; IBCB 348 e IBCB 408, com valores de valores de $2,30 \times 10^8$; $2,22 \times 10^8$; $2,08 \times 10^8$ e $1,75 \times 10^8$ conídios/grama de arroz + fungo, respectivamente. MENDONÇA & COSTA (1987) testaram a linhagem PL 191 de *M. anisopliae*, inoculando-se 10 mL de suspensão com $1,0 \times 10^8$ conídios/mL em 100 g de arroz parboilizado e 35% de água destilada. Após 18 dias de incubação, obteve-se um rendimento de conídios por grama de substrato ao redor de 12,8%.

NEVES (1998) trabalhando em condições laboratoriais não obteve diferença significativa entre o isolado E 9 com rendimento de $1,54 \times 10^9$ conídios/g de arroz + fungo e os isolados ESALQ 1037, ESALQ 1097 com rendimento de $3,37 \times 10^9$ e $1,04 \times 10^9$ conídios/g, respectivamente. Esses isolados foram selecionados para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). Já Fernandes (1991) verificou para os isolados 865, 866 e 259, produção da ordem de $3,23 \times 10^9$, $2,35 \times 10^9$ e $2,45 \times 10^9$ conídios/g.

TAKADA (2002) observou rendimento de $2,40 \times 10^8$, $2,32 \times 10^8$, $2,25 \times 10^8$ e $7,0 \times 10^6$ conídios/g de arroz + fungo, para os isolados IBCB 104, IBCB 233, IBCB 103 e E 9, respectivamente. Os dados desse autor apresentaram uma distribuição muito semelhante, utilizando-se a mesma técnica de produção, aos dados obtidos nessa pesquisa quando comparados aos demais relatados na literatura.

A diferença no rendimento de conídios para os isolados selecionados no presente trabalho quando comparada a isolados que produzem entre $8,8 \times 10^8$ a $3,0 \times 10^9$ conídios/g (ALVES & PEREIRA, 1989; NEVES, 1998) pode estar relacionada com a dificuldade de reproduzir-se, entre um experimento e outro, todas as condições disponíveis para o crescimento dos fungos

no arroz, tais como: teor de umidade e tempo de cozimento do arroz, variação na temperatura da sala de incubação e nível de contaminação (TAMAI, 1997). Somando-se a essas diferenças, são levados em conta, também, a técnica e escala de produção, intervalos da avaliação, variedades de arroz, diferentes condições de armazenamento e vigor do isolado (ALVES, 1998). Entretanto, estes resultados são importantes para a comparação da produção de isolados dentro do mesmo experimento.

Quanto a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*, apenas o isolado IBCB 482 teve menor porcentagem de germinação, ao redor de 80,3%. Os isolados IBCB 425; IBCB 348 e IBCB 408 apresentaram, respectivamente, 99,33; 99,29 e 99,21% de germinação (Tabela 1). Esses valores foram semelhantes aos encontrados por ALVES & PEREIRA (1989), sendo observada a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* variando de 90 a 100%.

CONCLUSÃO

Os isolados IBCB 348, IBCB 408, IBCB 410 e IBCB 425 são mais produtivos que os demais isolados testados. Apenas o isolado IBCB 482 apresenta menor capacidade de germinação após a produção e secagem.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro desta pesquisa e ao Centro Experimental do Instituto Biológico pela cessão das instalações, para a condução dos experimentos de laboratório.

Tabela 1 - Produção média de conídios em arroz (conídios/g) e viabilidade de isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (T = $25 \pm 1^\circ$ C; UR = $70 \pm 10\%$; fotofase de 12h).

Isolados	Produção de conídios ($\times 10^8$) ^{1,2} (\pm EP) ³	Viabilidade (%) ¹ (\pm EP) ³
IBCB 348	$2,08 \pm 0,28$ a	$99,29 \pm 0,25$ a
IBCB 351	$0,92 \pm 0,07$ b	$97,08 \pm 0,43$ a
IBCB 363	$0,87 \pm 0,04$ b	$97,71 \pm 0,42$ a
IBCB 408	$1,75 \pm 0,30$ ab	$99,21 \pm 0,27$ a
IBCB 410	$2,22 \pm 0,33$ a	$98,17 \pm 0,46$ a
IBCB 418	$0,96 \pm 0,03$ b	$97,92 \pm 0,47$ a
IBCB 425	$2,30 \pm 0,31$ a	$99,33 \pm 0,26$ a
IBCB 482	$0,86 \pm 0,03$ b	$80,33 \pm 3,84$ b
CV (%)	35,74	7,81

¹Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

²Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$.

³ Erro padrão da média.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S.B. & ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 20, p.637-711.
- ALVES, S.B. & LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.97-163.
- ALVES, S.B. & PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhiziumanisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. *Ecossistema*, v.14, p.188-192, 1989.
- ALVES, S.B. & PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 27, p.845-869.
- FERNANDES, P.M. *Controle microbiano de Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. 1991. 114p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.
- GUAGLIUMI, P. Cigarrinha da raiz. In: Brasil. Instituto do Açúcar e do Alcool. *Pragas da cana-de-açúcar*. Rio de Janeiro: IAA, 1972. p.622. (Coleção Canaveira IAA, n.10).
- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. *Produção de fungos entomopatogênicos*. Ribeirão Preto: O Estado de São Paulo, 2003. 92p.
- MENDONÇA, A.F. & COSTA, L.C.G. Rendimento da linhagem PL 191 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em diferentes substratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., 1987, Campinas, SP. *Resumos*. Campinas: 1987. p.248.
- NEVES, P.M.J. *Seleção de isolados de Beauveria bassiana e Metarhizium anisopliae e controle de Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera, Termitidae). 1998. 113p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- TAKADA, H.M. *Patogenicidade e seleção de isolados de Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae). 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- TAMAI, M.A. *Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de Tetranychus urticae* Koch. 1997. 86p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

Recebido em 3/11/05

Aceito em 28/12/05