

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

CONFEÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM ISOLADOS ENCONTRADOS EM CULTURAS AGRÍCOLAS E AMBIENTES DE PRESERVAÇÃO AMBIENTAL EM MATO GROSSO DO SUL

A.M. Rodrigues; E.S. Loureiro

Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Rod. Dourados-Itahum, km 12, CEP 79804-970, Dourados, MS, Brasil. E-mail: rodrigues_bio@yahoo.com.br

RESUMO

Com o avanço do desmatamento, a prática de culturas agrícolas não planejadas e a utilização de defensivos agrícolas tóxicos ao meio ambiente, estima-se que grande parte da diversidade de fungos entomopatogênicos presente no meio ambiente esteja sendo alterada. A preservação na forma de coleção de culturas é uma prática de fundamental importância para a manutenção da biodiversidade destes micro-organismos. Este trabalho objetivou a coleta sistematizada de amostras de solo e de insetos mortos e moribundos que apresentassem a extrusão do patógeno ou com características da doença, em culturas agrícolas e área de preservação ambiental. Os insetos coletados foram identificados e levados para o laboratório, onde se isolou o patógeno em meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em B.O.D. a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas, durante 7 dias. Após a obtenção de culturas puras, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça metálica, armazenados em tubos plásticos do tipo Eppendorf, e mantidos em freezer a -4°C . Até o momento foram isolados os fungos entomopatogênicos: *Beauveria bassiana*, parasitando *Lagria villosa* (UFGD 01), *Hypothenemus hampei* (UFGD 06 e UFGD 11), um inseto da família Crisomellidae (UFGD 02) e do solo (UFGD 16); o fungo *Metarhizium anisopliae* parasitando *Zulia entreriana* (UFGD 05), *Mahanarva fimbriolata* (UFGD 03), *M. posticata* (UFGD 07) e do solo (UFGD 12); *Paecilomyces fumosoroseus* atacando um inseto da família Scarabaeidae (UFGD 04), *Lagria villosa* (UFGD 13) e do solo (UFGD 09 e 15); *P. farinosus* isolado a partir do solo (UFGD 08) e o fungo *Nomuraea rileyi* parasitando a lagarta *Anticarsia gemmatalis* (UFGD 14).

PALAVRAS-CHAVE: Coleção de culturas, fungos entomopatogênicos, controle microbiano.

ABSTRACT

THE MAKING OF AN ENTOMOPATHOGENIC FUNGAL COLLECTION, OF STRAINS FOUND IN CROPS AND ENVIRONMENTAL PRESERVATION AREAS, IN THE STATE OF MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL. With the advance of deforestation, the practice of unplanned farming and the use of toxic pesticides in the environment, it is estimated that the major part of the diversity of entomopathogenic fungi present in the environmental has been disturbed. Preservation in the form of a culture collection is a fundamentally important practice for the maintenance of the diversity of these microorganisms. The present study was aimed at the systematical collection of sample soil and dead and moribund insects that present the extrusion of such pathogens or with characteristics of such diseases in crops or environmental preservation areas. The insects were collected and identified in the laboratory, where the pathogen was isolated in PDA culture medium. The Petri dishes were maintained in a B.O.D. chamber at $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH and 12 hours of photophase, for 7 days. After obtaining pure cultures, the conidia were harvested with a metallic loop, stored in plastic Eppendorf tubes, and maintained in a freezer at -4°C . Up to the present, the following entomopathogenic fungi have been isolated: *Beauveria bassiana* parasitizing *Lagria villosa* (UFGD 01), *Hypothenemus hampei* (UFGD 06 and UFGD 11), an insect of the Crisomellidae family (UFGD 02), and from soil (UFGD 16); the fungi *Metarhizium anisopliae* parasitizing *Zulia entreriana* (UFGD 05), *Mahanarva fimbriolata* (UFGD 03), *M. posticata* (UFGD 07) and from soil (UFGD 12); *Paecilomyces fumosoroseus* attacking an insect of the Scarabaeidae family (UFGD 04), *L. villosa* (UFGD 13), and from soil (UFGD 09 and UDFG 15); *P. farinosus* isolated from soil (UFGD 08), and the fungi *Nomuraea rileyi* parasitizing the caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (UFGD 14).

KEY WORDS: Culture collections, entomopathogenic fungi, microbial control.

As coleções de culturas de micro-organismos têm uma particular importância na conservação *ex situ* da diversidade microbiana (SLY, 1998). O material biológico preservado por métodos adequados em coleções de cultura tem um amplo espectro de aplicações nas áreas de saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente (CANHOS *et al.*, 2006). O potencial da biodiversidade, neste país, tem sido largamente discutido e sua conservação priorizada. A destruição dos sistemas naturais, por meio da prática de produção, tem gerado a preocupação pela preservação dos organismos benéficos. A integridade do nosso patrimônio genético é um indicativo de nível de desenvolvimento tecnológico e respeito pela natureza (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2002).

Além de sua importância como fonte de variabilidade genética para seleção de patógenos ou de isolados de patógenos de insetos, o banco de micro-organismos entomopatogênicos é também uma fonte de recursos genéticos utilizados em programas de biotecnologia, melhoramento genético e em outras áreas do conhecimento, proporcionando aos institutos, universidades, empresas e aos que trabalham com micro-organismos entomopatogênicos, material genético a ser aplicado e conservado em longo prazo, devido à sua importância como agente de controle de pragas e até, se for o caso, para uma produção comercial do patógeno (EMBRAPA-CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLÓGICOS, 1996). Resultados obtidos por FARIA *et al.* (1999) indicaram que as formas mais eficientes para a preservação de conídios de fungos entomopatogênicos para uma coleção biológica são os métodos de preservação em nitrogênio líquido, onde em média perdeu-se 13,3% da viabilidade conidial após 16 à 84 meses de armazenamento e o método de liofilização, onde após 29 à 49 meses de armazenamento ocorreu uma perda de 28,6 à 94,5% da viabilidade de germinação. Os resultados encontrados confirmam a eficiência dos métodos testados, porém essas técnicas de preservação requerem um alto investimento.

Os micro-organismos patogênicos a insetos estão amplamente distribuídos na natureza, tendo destaque os fungos parasitos de insetos. Aproximadamente 80% das doenças têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes à cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies, sendo que a maioria dos gêneros relatados de fungos entomopatogênicos ocorre no Brasil (ALVES, 1998). Mais de 20 gêneros já foram constatados atacando insetos de importância agrícola, seja na forma enzoótica e/ou epizoótica (ALVES, 1992). Com a degradação maciça dos ambientes naturais, o avanço de culturas agrícolas não planejadas e a utilização indiscriminada de produtos fitossanitários químicos tóxicos ao meio ambiente estima-se que grande parte da diversidade de fungos entomopatogênicos, com potencial de utilização em programas de controle microbiano de pragas, seja, perdida. O solo neste

contexto caracteriza-se como um grande reservatório natural de fungos entomopatogênicos, e é o fator mais afetado por estas práticas. Desta maneira, a coleta, o isolamento e a preservação em coleções de culturas de fungos patogênicos a insetos de importância agrícola, em seu ambiente natural, é uma prática de fundamental importância para a preservação da biodiversidade de entomopatógenos.

Com esse propósito foram coletados insetos mortos e moribundos que apresentaram a extrusão do patógeno ou com características da doença, nas culturas de trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*), aveia (*Avena strigosa*), cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e pastagens (*Brachiaria decumbens*), além de coletas de solo em matas de preservação ambiental no Município de Dourados e na região do Pantanal-Abobral em Mato Grosso do Sul.

Os insetos coletados e as amostras de solo foram armazenados em recipientes plásticos estéreis, identificados e levados para o laboratório. Foram anotados dados do ambiente assim como a coloração que o inseto apresentava, uma vez que, segundo BATISTA FILHO *et al.* (1988), esta, em alguns casos pode fornecer subsídios para a identificação do patógeno.

O isolamento de fungos entomopatogênicos, a partir de insetos, é facilitado quando este se encontra em fase de reprodução (conidiogênese), ou seja, quando a superfície do hospedeiro apresenta-se coberta por conídios. Caso não houvesse ocorrido a extrusão do patógeno sobre os insetos coletados, eles foram colocados em placas de Petri, esterilizadas, contendo uma porção de algodão hidrófilo umedecido em água destilada esterilizada, confeccionando-se assim uma câmara úmida. As placas foram vedadas com filme plástico (PVC), e mantidas em B.O.D a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas até que o inseto apresentasse extrusão do patógeno, distinguido pelo crescimento micelial característico sobre o tegumento do inseto.

O isolamento dos fungos foi realizado em câmara asséptica. Foram confeccionadas placas de Petri (9 cm de diâmetro) com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) ou ainda SDA (Sabouraud-dextrose-ágar) sendo inoculados em três pontos equidistantes. As placas foram vedadas com plástico filme (PVC) e mantidas em B.O.D. nas mesmas condições descritas anteriormente durante o período de 7 a 15 dias, quando foi observado o crescimento micelial por toda a placa. Para o isolamento de fungos entomopatogênicos a partir do solo seguiu-se a metodologia proposta por LEITE *et al.* (2003), onde as amostras do solo foram homogeneizadas e, então, subamostradas retirando-se de cada uma delas 1 g de material. As subamostras foram acrescidas a um volume de água na proporção de 1:100 (solo/água). Após agitação, foram feitas diluições sucessivas, totalizando cem vezes para, em seguida, ser inoculado

1 mL da última diluição em meio de cultura BDA. Os fungos foram repicados em BDA até que se obtivessem culturas puras dos micro-organismos.

Culturas puras dos fungos foram submetidas à análise microscópicas efetuando-se a identificação e classificação, com auxílio de chaves taxonômicas (ALVES, 1998; ALVES *et al.*, 1998; ALVES; LOPES, 2008). Após a constatação do entomopatógeno, cada isolado foi multiplicado por meio de sementeira com alça de platina e posterior espalhamento em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. As placas foram transferidas para B.O.D. nas mesmas condições climáticas citadas anteriormente por um período de 7 a 10 dias. Posteriormente, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça metálica e armazenados em tubos plásticos do tipo Eppendorf e mantidos em freezer a -4° C.

MAC LEOD (1954) descreveu o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. como sendo o patógeno mais comumente encontrado na natureza. *B. bassiana* foi isolado de *Lagriavillosa* (Coleoptera: Lagriidae) (UFGD 01), de um inseto coleoptera da família Crisomellidae (UFGD 02), de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) (UFGD 06 e UFGD 11) e de amostras de solo (UFGD 16). O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. é um deuteromiceto da família Moniliaceae que se caracteriza por atacar um grande número de espécies de insetos (ALVES, 1998). Este patógeno foi isolado de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) (UFGD 03), de *Zulia entreriana* (Hemiptera: Cercopidae) (UFGD 05), de *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae) (UFGD 07) e a partir de amostras do solo (UFGD 12). O gênero *Paecilomyces*,

segundo ALVES (1998), causa a doença conhecida como muscardine amarela em insetos. Esse fungo é um dos mais importantes inimigos naturais da mosca-branca no mundo inteiro (LACEY; GOETTEL, 1995; WRAIGHT *et al.*, 2000). O fungo *P. fumosoroseus* (Wise) (Holm ex SF Gray) foi isolado de um inseto pertencente a ordem Coleoptera, família Scarabaeidae (UFGD 04), de *Lagriavillosa* (Coleoptera: Lagriidae) (UFGD 13) e de amostras de solo (UFGD 09 e UFGD 15). O fungo *P. farinosus* (UFGD 09) foi isolado a partir de amostras do solo. O gênero *Nomuraea* ocorre naturalmente sobre pragas de algumas culturas econômicas, em muitas regiões do mundo, ocorrendo em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleoptera, Orthoptera e Lepidoptera, sendo esta última ordem representada por 90% dos hospedeiros de *N. rileyi* para as condições do Brasil (ALVES, 1998). O fungo *Nomuraea rileyi* (UFGD 14) foi isolado a partir da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Tabela 1).

Durante os períodos de coletas (2005-2007) foram observadas condições climáticas desfavoráveis como estiagens prolongadas e altas temperaturas para a região da Grande Dourados, de acordo com dados fornecidos pela Estação Meteorológica da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da UFGD (ESTAÇÃO METEOROLÓGICA, 2007), o que pode, associado a fatores como a corrente utilização de inseticidas, fungicidas e herbicidas na região, ter afetado a ocorrência natural destes organismos nos ambientes de coleta. A temperatura de acordo com ALVES; LECUONA (1998), afeta a ocorrência natural em nível de campo, limitando a maioria dos patógenos.

Tabela 1 - Relação dos isolados de fungos entomopatogênicos coletados em culturas agrícolas e em área de preservação ambiental no Estado de Mato Grosso do Sul, depositados no Banco de Fungos Entomopatogênicos da Universidade Federal da Grande Dourados.

Código do isolado	Patógeno	Hospedeiro	Ordem e família	Local de coleta
UFGD 01	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Lagriavillosa</i>	Coleoptera: Lagriidae	Itahum, MS
UFGD 02	<i>Beauveria bassiana</i>	Inseto	Coleoptera: Crisomellidae	Dourados, MS
UFGD 03	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Hemiptera: Cercopidae	Itahum, MS
UFGD 04	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Inseto	Coleoptera: Scarabaeidae	Itahum, MS
UFGD 05	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Zulia entreriana</i>	Hemiptera: Cercopidae	Itahum, MS
UFGD 06	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	Glória de Dourados, MS
UFGD 07	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>	Hemiptera: Cercopidae	Itahum, MS
UFGD 08	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Solo	-	Corumbá, MS
UFGD 09	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Solo	-	Corumbá, MS
UFGD 11	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Scolytidae	Dourados, MS
UFGD 12	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Solo	-	Corumbá, MS
UFGD 13	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	<i>Lagriavillosa</i>	Coleoptera: Lagriidae	Dourados, MS
UFGD 14	<i>Nomuraea rileyi</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lepidoptera: Noctuidae	Dourados, MS
UFGD 15	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Solo	-	Corumbá, MS
UFGD 16	<i>Beauveria bassiana</i>	Solo	-	Corumbá, MS

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, s/n, p.77-86, 1992. [Edição especial].
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 11, p.289-381.
- 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*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 5, p.97-169.
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B. *Controle microbiano de pragas na América Latina*. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414p.
- BATISTA FILHO, A.; FIGUEIREDO, M.B.; CRUZ, B.P.B.; Fungos entomopatogênicos. In: CRUZ, B.P.B. (Coord.). *Pragas das culturas e controle biológico*. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p.36-52.
- CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F.; SOUZA, R.D.F. Diretrizes e estratégias para a melhoria das coleções microbiológicas brasileiras, tendo como meta a implantação e consolidação da Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos no horizonte de 10 anos. In: KURY, A.B. (Ed.). *Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade*. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006. Cap. 4, p.213-240.
- EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnológicos. *Coleção de fungos entomopatogênicos do CENARGEN*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. 76p.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS. Estação Meteorológica da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) Dourados, 2007. Disponível em: <http://201.3.11.197/~clima/dados_meteorologicos.htm>. Acesso em: 1 jun. 2007.
- FARIA, M.R.; MARTINS, I.; MELLO R.; TIGANO, M. S. Entomopathogenic fungal (Hyphomycetes) collection: assessment of conidial viability. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, n.8, p.1497-1503, 1999.
- LACEY, L.A.; GOETTEL, M. Current developments in microbial control of insect pest and prospect for the early 21st century. *Entomophaga*, v.40, n.3, p.27, 1995.
- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. *Produção de fungos entomopatogênicos*. Ribirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92p.
- MAC LEOD, D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany*, v.32, n.6, p.818-890, 1954.
- SLY, L.I. Australian Microbial Resources: Exploring the need for a priority research program on Australian Microbial Diversity incorporating support for a network of Australian Collections of Microorganisms and Genetic Resources, and an Australian Microbial Resources Information Network. *Microbiology Australia*, v.19, n.1, p.27-35, 1998.
- SOSA-GÓMES, D.R.; SILVA, J.J. *Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados*. Londrina: Embrapa Soja, 2002, 32p. (Documentos 188).
- WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I.; JARONSKI, S.T.; BRADLEY, C.A.; GARZA, C.J.; GALAINI-WRAIGHT, S. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, v.17, n.3, p.203-217, 2000.

Recebido em 13/10/07

Aceito em 4/5/09