

Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) cultivados em arroz

Yield of conidia and germination of different isolates of Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) grown on rice

Alessandra Fequetia Freitas^{1*}, Elisângela de Souza Loureiro^{1,2}, Maria Eliete Barbosa de Almeida¹, Luis Gustavo Amorim Pessoa²

RESUMO: O objetivo desta pesquisa foi determinar a produção e a viabilidade de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* em arroz. Foram colocados em sacos de polipropileno medindo 35 cm de comprimento e 22 cm de largura 100 g de arroz pré-cozido, imediatamente autoclavados a 120 °C, por 25 minutos. Após o resfriamento do arroz, inoculou-se 1 mL de uma suspensão contendo $1,0 \times 10^9$ conídios/mL de cada isolado testado, sendo acondicionados em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 horas de incubação por 10 dias. Decorrido esse período, o arroz + fungo foi acondicionado em bandejas plásticas para promover a conidiogênese do fungo, dentro da câmara climática a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 horas. As bandejas ficaram empilhadas por quatro dias, cruzando-as por mais quatro dias. O isolado IBCB 425 foi o que mais produziu conídios em arroz com $1,82 \times 10^9$ conídios/g de arroz pré-cozido pelo método de bandeja. Com relação à viabilidade dos isolados, o IBCB 425 também apresentou maior capacidade de germinação dos conídios, com 94,84%.

PALAVRAS-CHAVE: controle microbiano; fungos entomopatogênicos; insecta.

ABSTRACT: In order to determine the production and viability of different isolates of *Metarhizium anisopliae*, 100 g of pre-cooked rice were placed in 35 cm long and 22 cm wide polypropylene bags, being immediately autoclaved at 120°C for 25 minutes. After cooling down, the rice was inoculated with 1 mL of a suspension containing $1,0 \times 10^9$ conidia/mL, packed in an incubator at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH and 12 hours of photophase. Plastic bags containing rice + fungus were incubated for 10 days. After this period, rice + fungus was packed in plastic trays to promote fungal conidiogenesis, within the climatic chamber at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH and 12 hours of photophase. The trays were stacked for four days, being crossed for another four days. The IBCB 425 isolate was the most produced conidia on rice with 1.82×10^9 conidia/g of pre-cooked rice by the tray method. Regarding the viability of the isolates, IBCB 425 also showed a higher germination of conidia, with 94.84%.

KEYWORDS: microbial control; entomopathogenic fungi; insecta.

¹Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais; Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) – Dourados (MS), Brasil.

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) – Chapadão do Sul (MS), Brasil.

*Autor correspondente: a_ffreitas@yahoo.com.br

Recebido em: 17/08/2012. Aceito em: 20/12/2013.

A colheita de cana-de-açúcar sem queima previa favoreceu a incidência da cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). Se não houver queima da palhada, ocorre o acúmulo desse material no solo e aumento da umidade, facilitando assim o crescimento e a disseminação da cigarrinha-da-raiz da cana (BATISTA FILHO *et al.*, 2003), que se tornou uma das pragas de maior importância econômica para a cana-de-açúcar.

Altas infestações da cigarrinha-da-raiz em cana planta e soqueiras de cana queimada encontram-se nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (FREITAS *et al.*, 2012) e Goiás, devido à vizinhança da cultura com vastas áreas de pastagens, cujos capins também são hospedeiros de *M. fimbriolata* (DINARDO-MIRANDA, 2003).

Os danos provocados por *M. fimbriolata* ocorrem tanto na fase de ninfa como na de adulto. As ninfas, através de picadas nas raízes, provocam danos aos vasos, os quais impedem o fluxo de água e nutrientes. Os adultos provocam danos nas folhas ao injetarem toxinas que prejudicam sensivelmente a capacidade de fotossíntese das plantas (GARCIA *et al.*, 2007).

O controle microbiano com o *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) tem tido sucesso com as cigarrinhas-das-raízes, uma vez que a espuma produzida pelas ninfas proporciona condição favorável ao crescimento do fungo.

Além disso, outras características desejáveis para que esse patógeno seja efetivo como produto comercial devem ser consideradas. Entre elas, pode-se destacar a facilidade de produção e aplicação, a especificidade e a ausência de toxicidade, além de permitir a associação desses organismos com outras táticas de controle, viabilizando sua utilização em grandes áreas (ALVES, 1998).

A produção em larga escala do fungo *M. anisopliae* no Brasil teve início na região dos canaviais nordestinos, objetivando o controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* Stal, 1855 (PEREIRA; EIRA, 1999), e ele vem sendo produzido e comercializado com grande sucesso. É um dos mais bem sucedidos programas de controle biológico na América Latina (ALVES *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2008).

As técnicas de produção de fungos para controle de pragas devem ter baixo custo e permitir a obtenção de alta concentração de formas viáveis e virulentas do patógeno, as quais possam ser formuladas e utilizadas (LOUREIRO *et al.*, 2005). A facilidade de produção em larga escala viabiliza a utilização desses agentes de maneira inundativa (ALVES; PEREIRA, 1998). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção e a viabilidade dos isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, selecionado em laboratório, para o controle de ninfas da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar no estado do Mato Grosso do Sul.

Foram utilizados os isolados de *M. anisopliae* IBCB 348 (isolado de *M. fimbriolata*), IBCB425 (isolado de lagarta),

PL 43 (isolado de *M. posticata*), UFGD 03 (isolado de *M. fimbriolata*), UFGD 05 (isolado de *Zulia entreriana*), UFGD 22 (isolado de *M. fimbriolata*) e UFGD 28 (isolado de *Deois flavopicta*), os quais foram mais virulentos às ninfas de *M. fimbriolata*, apresentando mortalidade confirmada acima de 70%, determinada em ensaio anterior. Esses isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), as quais foram incubadas durante dez dias em câmara climatizada BOD à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas para promover o crescimento e esporulação do fungo. Após dez dias, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça metálica, e então foi preparada uma suspensão contendo $1,0 \times 10^9$ conídios/mL com água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80[®]) a 0,1%.

Inicialmente, realizou-se o cozimento do arroz por cerca de 15 minutos, até que este apresentasse a textura “emborrachada”, sendo em seguida colocado em bandejas. Após o resfriamento, foram colocados 100 g de arroz em sacos de plástico de polipropileno (35 cm de comprimento x 22 cm de largura), os quais foram fechados com grampos de metal autoclavados por 25 minutos a 120°C , e resfriados em condição ambiente.

Para inoculação de cada isolado de *M. anisopliae* utilizou-se uma seringa descartável para perfurar o saco plástico, contendo 1 mL de uma suspensão de conídios com $1,0 \times 10^9$ conídios/mL. Após a inoculação, os sacos foram acondicionados por dez dias em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas para a germinação dos conídios e crescimento do fungo sobre o arroz. Foram realizadas observações diárias, avaliando-se, visualmente, a presença ou ausência de eventuais contaminantes. Para cada isolado foram utilizados 12 sacos plásticos contendo arroz inoculado.

Após este período, foram selecionados para cada isolado seis sacos não contaminados com crescimento uniforme de micélio. Seus conteúdos foram transferidos, um a um, para uma bandeja plástica de 46 cm de comprimento, 30 cm de largura e 11 cm de altura. As bandejas foram mantidas empilhadas dentro da câmara climatizada nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente por oito dias. No quarto dia, as bandejas foram cruzadas e empilhadas, permitindo assim uma circulação de ar entre elas e, conseqüentemente, a secagem mais rápida do arroz com fungo. Decorridos os oito dias, o material contido na bandeja foi colocado em sacos plásticos, totalizando seis sacos plásticos para cada isolado, que serviram como repetição e foram armazenados em geladeira (4°C) (ALVES; PEREIRA, 1989).

Para exame da concentração dos conídios foram retiradas ao acaso seis amostras de 1 g de arroz com fungo a uma profundidade de 1,5 cm 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. Em

seguida, as amostras foram diluídas em série e quantificadas em câmara de Neubauer, com o auxílio do microscópio óptico com aumento de 400 x. Dessa forma, foi possível determinar o número de conídios produzidos por grama para cada isolado (ALVES; PEREIRA, 1998).

Para avaliação da viabilidade, foram retiradas ao acaso duas amostras de 1 g de arroz com fungo de cada bandeja e, para cada amostra, foram preparadas quatro placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), inoculado com os diferentes isolados do fungo, totalizando oito placas por isolado. As placas foram incubadas por 20 horas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e 12 horas de fotofase. Em seguida, cada placa foi dividida em quatro quadrantes. Quantificou-se o número de conídios germinados e não germinados dos quadrantes em microscópio óptico com objetiva de 400 x (ALVES *et al.*, 1998).

Os valores da produção e da viabilidade dos conídios foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados dos valores de produção foram transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$, e os de viabilidade para arsen $(x/100)^{1/2}$.

Os isolados IBCB 425 e IBCB 348 foram os mais produtivos, não diferindo estatisticamente entre si, com rendimentos de $1,82 \times 10^9$ e $1,75 \times 10^9$ conídios/grama de arroz, respectivamente (Tabela 1). Esses dados são superiores aos encontrados por LOUREIRO *et al.* (2005), que obtiveram rendimento de $2,30 \times 10^8$ e $2,08 \times 10^8$ conídios/grama de arroz para os isolados IBCB 425 e IBCB 348, respectivamente.

Os isolados UFGD 28 e UFGD 22 diferiram estatisticamente dos isolados UFGD 03, UFGD 05 e PL 43, obtendo rendimento de $1,58 \times 10^9$ e $1,56 \times 10^9$ conídios/grama de arroz, respectivamente (Tabela 1). ALVES; PEREIRA (1989), utilizando o mesmo processo, obtiveram um rendimento menor em conídios, com produção de até $8,8 \times 10^8$ conídios/g.

Segundo ALVES; PEREIRA (1998), para *M. anisopliae* o rendimento pode chegar até 11% de conídios em relação ao peso do arroz utilizado na produção. Em escala industrial, médias de rendimento em torno de 9% são mais prováveis.

Embora o isolado do fungo IBCB 348 seja o ingrediente ativo de algumas biofábricas de fungos entomopatogênicos do país, MACEDO (2005) demonstrou que a produção de conídios do isolado ESALQ 1037, pelo método da bandeja, diferiu estatisticamente da produção de conídios do isolado IBCB 348 nas mesmas condições. O isolado ESALQ 1037 apresentou maior produção, $3,49 \times 10^9$ conídios/grama de arroz, enquanto o IBCB 348 apresentou $2,29 \times 10^9$ conídios/grama de arroz. Essa diferença no rendimento depende não só do isolado usado, mas também da sua adaptação ao método de produção. Também pode estar relacionada ao teor de umidade, à variação da temperatura da sala de incubação,

Tabela 1. Produção média de conídios/grama de arroz esporulado e viabilidade de isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (T = $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR = $7 \pm 10\%$; fotofase de 12 horas).

Tratamentos	Produção de conídios ($\times 10^9$) **	Viabilidade (%) ***
PL 43	1,11 d	85,46 c
UFGD 05	1,37 c	80,87 d
UFGD 03	1,41 c	85,87 c
UFGD 22	1,56 b	89,18 b
UFGD 28	1,58 b	90,00 b
IBCB 348	1,75 a	89,46 b
IBCB 425	1,82 a	94,84 a
CV (%)	23,29	6,48

*Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Scott-Knott; #Dados transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$; **Dados transformados em arsen $(x/100)^{1/2}$.

às diferentes condições de armazenamento, aos níveis de contaminação, ao vigor do isolado, às variedades e ao tempo de cozimento do arroz (ALVES, 1998). Ressalta-se que o acúmulo de proteína bruta em certas variedades de arroz pode ser o fator responsável pela diferença no rendimento de conídios para os isolados selecionados no presente trabalho, quando comparados com outros experimentos. Segundo ARAÚJO *et al.* (2003), esse teor de proteína bruta ainda pode mudar para as mesmas variedades quando submetidas a diferentes condições ambientais.

Quanto à viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*, o IBCB 425 apresentou maior porcentagem de germinação, de 94,84%. Os isolados UFGD 22, IBCB 348 e UFGD 28 apresentaram, respectivamente, 89,18; 89,46; 90,00% de germinação (Tabela 1). Esses valores foram inferiores aos encontrados por LOUREIRO *et al.* (2005), sendo observada a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* para os isolados IBCB 425 e IBCB 348, de 99,33 e 99,29% respectivamente.

O poder germinativo dos esporos é visivelmente influenciado, em caráter negativo, pelo aumento de manipulação, o que leva a viabilidade dos esporos a ser alterada em função do tipo de preparo do fungo. Os baixos níveis de germinação em “arroz + esporos” moído em relação ao “arroz + esporos” são uma consequência da operação de moagem. A excessiva manipulação da matéria-prima e o aquecimento do moinho acarretam prejuízos aos esporos (CRUZ *et al.*, 1985).

BATISTA FILHO *et al.* (2003) observaram que o controle de *M. fimbriolata* com *M. anisopliae* é influenciado pelos isolados utilizados, sendo que no experimento realizado as diferenças entre os isolados produzidos ficou evidente, sendo apenas o IBCB 425 o que mais produziu conídios em arroz pelo método da bandeja, e também o que apresentou maior capacidade de germinação em relação aos demais isolados testados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds). *Controle microbiano dos insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-381.
- ALVES, S.B.; LOPES, J.R.S.; ALVES, L.F.A.; MOINO JÚNIOR, A. Controle microbiano de artrópodos associados a doenças de plantas. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). *Controle biológico*. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p.143-170.
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds). *Controle microbiano de pragas na América Latina*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.69-110.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. *Ecossistema*, v.14, n.14, p.188-192, 1989.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.845-870.
- ARAÚJO, E.S.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.11, p.1281-1288, 2003.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES, S.B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (HOM.: CERCOPIDAE). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.70, n.3, p.309-314, 2003
- CRUZ, B.P.B.; ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; OLIVEIRA, D.A. Efeito da temperatura, tempo de armazenagem e do tipo de preparo, sobre o poder germinativo de esporos de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, cultivado em arroz. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.52, p.45-57, 1985.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agronômico, 2003. 72p.
- FREITAS, A.F.; LOUREIRO, E.S.; ALMEIDA, M.E.B.; PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.79, p.247-254, 2012.
- GARCIA, J.F.; GRISOTO, E.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Feeding site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. *Scientia Agrícola*, v.64, n.5, p.555-557, 2007.
- LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.4, p.469-472, 2005.
- MACEDO, D. *Seleção e caracterização de Metarhizium anisopliae visando ao controle de Mahanarva fimbriolata (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) em cana-de-açúcar*. 2005. 87f. Tese (Doutorado-Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005. Acesso em: 10 fev. 2010.
- PEREIRA, S.R.M.; EIRA, A.F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. *Ciência Rural*, v.29, n.3, p.389-394, 1999.