

## AVALIAÇÃO DO TEMPO DE VIABILIDADE PARA APLICACAO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* APÓS DILUIÇÃO EM ÁGUA.

### EVALUATION FEASIBILITY APPLICATION TIME FOR *Metarhizium anisopliae* FUNGUS AFTER DILUTION INTO WATER

<sup>1</sup>VASCONCELOS, M.F.; <sup>2</sup>VENERANDO, R.; <sup>3</sup>FRANCISCO, O.

<sup>1,2e3</sup>Departamento de Ciências Biológicas – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

#### RESUMO

Entre os métodos de controle de pragas da cana, em especial da cigarrinha da cana *Mahanarva fimbriolata*, destaca-se o controle biológico onde faz-se o uso do fungo *Metarhizium anisopliae*, o qual tem sido extensivamente utilizado. No entanto, a aplicação do fungo está relacionado com as exigências para viabilidade do fungo, havendo necessidade de boas condições meteorológicas para sua aplicação. Tais condições estão relacionadas com os dias com maior disponibilidade de umidade relativa do ar. Nestas condições, imediatamente são preparadas as diluições para sua dispersão no campo, porém, são utilizadas geralmente as diluições recentes (período de 2 a 4 horas após a diluição), sendo geralmente descartadas aquelas que ultrapassarem este período. Até o momento, não há trabalhos mostrando a correlação entre período após a diluição dos esporos em água e sua viabilidade de germinação. Desta forma, com o objetivo de realizar a estimativa de tempo e a viabilidade de germinação do fungo, uma solução mãe realizada a partir da diluição de 10 gramas de cultura pura de *Metarhizium anisopliae* cultivada em arroz (Arroz + Fungo – Diluição 10<sup>0</sup>) em 100 ml de Solução Tween 80 (em diluição de 0,1% em água ultra purificada), foi diluída até a solução 10<sup>-4</sup> esporos e em seguida, amostras de 100 µL desta diluição foram semeadas em ágar BDA e observadas em intervalos de 2 horas até que atingiram 72 horas. Concluiu-se que após a 36<sup>a</sup> hora após a diluição, a viabilidade de germinação cai para valores inferiores a 50%, trazendo inviabilidade de uso após este período.

**Palavras-chave:** Controle Biológico. *Metarhizium anisopliae*. Cultura de Cana. *Mahanarva fimbriolata*.

#### ABSTRACT

On citations to the methods of control sugarcane pests, especially the sugarcane leafhopper *Mahanarva fimbriolata*, highlight it the biological control, and in this case, use of the fungus *Metarhizium anisopliae*, method that has been extensively used. However, the application of the fungus is related to the requirements for viability of the fungus, requiring good weather for its application. Such conditions are related to the greater availability of days with relative humidity. Accordingly, the dilutions are readily prepared for their dispersion in the field, being generally used recents dilutions (along 2 to 4 hours after dilution), the same are discarded generally those that exceed this period. To date, there are no studies showing the correlation between time after dilution of spores in water and germination viability spores. Thus, in order to calculates the time estimative to viability and respective numbers to fungus germination spores, a stock solution was prepared by diluting 10 grams of pure cultures of *Metarhizium anisopliae* grown in rice (Rice + Fungus - into 10<sup>0</sup> dilution) in 100 ml of Tween 80 solution (in 0.1% dilution of ultra-purified water), being on sequence diluted into 10<sup>-4</sup> spore solution and then 100 µL of this dilution were seeded in BDA ágar, wich were observed in 2 hour intervals until it reached 72 hours. It is concluded that after the 36th hour after the dilution, the germination viability falls below 50%, showing impracticality of use thereafter to this method.

**Keywords:** Biological Control. *Metarhizium anisopliae*. Sugar Cane Culture. *Mahanarva fimbriolata*.

#### INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é considerado como o maior produtor de cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* Linnaeus 1758 (Poales: Poaceae), fato que caracteriza o país na liderança mundial em tecnologia de produção do biocombustível etanol. Além de

matéria-prima para a produção de açúcar e álcool, seus subprodutos e resíduos são utilizados para cogeração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizante para as lavouras. (BRASIL, 2014).

O Brasil possui uma área de cultivo de aproximadamente 9.130,1 mil hectares distribuídos em todos os estados. São Paulo lidera como o maior produtor com 51,7% de área plantada, seguido de Goiás 9,3%, Minas Gerais 8,9%, Mato Grosso do Sul 7,4%, Paraná 6,7%, Alagoas 4,7% e Pernambuco com 3,2%. Estes estados correspondem por 91,9% da produção de cana-de-açúcar nacional, os demais estados produtores possuem representações abaixo de 3,0%. (BRASIL, 2014).

A lei estadual de número 6.171/88 (Decreto-lei Estadual nº 42.056/97) que determina a proibição da queima de cana-de-açúcar no estado de São Paulo. Tal cenário tem determinado expressivo aumento na proliferação de insetos e ácaros, em função das mudanças do tipo de manejo nesta agrobiocenose. Desta forma, observa-se que os níveis de pragas aumentaram consideravelmente com o corte mecanizado, quando comparados com a forma de corte convencional (cana queimada) e conforme descreve Arrigoni (2012) a espécie *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854), conhecida como cigarrinha-da-raiz, tornou-se favorecida, pois devido à presença da palha na cana-de-açúcar crua cria-se ecótopos os quais facilitam a proliferação destes insetos, tornando-os desta forma, uma das principais pragas desta cultura.

A técnica do uso de controle biológico vem crescendo nos últimos tempos, principalmente para o controle de pragas na cultura de cana-de-açúcar, por apresentar uma grande vantagem, tanto pelo baixo custo quanto pela eficácia e ainda quanto à sustentabilidade. Não obstante, denota-se ainda que sua aplicação não compromete o ambiente e principalmente por apresentar grande valor agregado às questões ambientais, contribui por não conter elementos químicos prejudiciais ao solo, animais e ao homem. (FRANCESCHINI, 2001).

De acordo com Tiago e Silva (2007), o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1879 (Hypocreales: Clavicipitaceae) é utilizado no controle das cigarrinhas-da-raiz, onde apresenta uma grande eficiência no controle desta praga.

Nascimento (2003) descreve que o fungo penetra no inseto via tegumento em diferentes estágios, suas hifas atingem as partes vitais, causando alterações nos sistemas circulatórios, reprodutor, digestório e nervoso, devido à grande capacidade de disseminação.

Conforme descrito por Garcia (2008), a utilização do fungo *M. anisopliae* vem sendo utilizada a séculos como controlador biológico, sendo hospedeiro em um grande percentual dos artrópodes, com eficácia em mais de 300 espécies de insetos. Loureiro et al. (2012) trabalhando com *Mahanarva fimbriolata* observaram em sua pesquisa uma eficiência no controle da praga, com os percentuais de mortalidade de 63% em ninfas e 100% nos adultos, após 30 dias da aplicação.

O presente trabalho justifica-se pela escassez de informações acerca do tempo de viabilidade em formulações de esporos de *Metarhizium anisopliae*, pois tais informações configuram uma necessidade imprescindível para que agricultores conheçam a faixa de segurança, estabelecida pelo período de aplicação após o processo de lavagem.

Assim, foram objetivos deste trabalho avaliar o tempo viável para a aplicação dos esporos no campo, após a diluição em solução de água + Tween 80 (a 0,1 %).

## MATERIAL E MÉTODOS

Esporos de *Metarhizium anisopliae* foram obtidos por concessão do Laboratório de Entomologia da Usina São Luiz, localizada na cidade de Ourinhos, os quais encontravam-se acondicionados em sacos plásticos em cultura de arroz. Para determinação da concentração ideal, a fim de verificar a contagem média ideal de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias), foi realizada uma diluição de 5 gramas de arroz + fungo em 50 mL de Solução de Tween 80 a 0,1% (Água ultrapura 999 mL + Tween 80 1 mL), por meio de lavagem em agitador magnético por 15 minutos. Após agitação, obteve-se a solução mãe (considerada 100% ou  $10^0$ ). Foram então disponibilizados mais 11 tubos, que considerando-se o instante inicial, somaram 12 tubos. Em cada um dos 11 tubos, foi disponibilizado 9 mL de Solução Tween 0,1%, conforme descrito anteriormente. Em sequência, 1 mL foi retirado da solução mãe ( $10^0$ ) e passado para o tubo rotulado como  $10^{-1}$  e desta maneira também foram retiradas e distribuídas as diluições fracionadas subsequentes, até que se obteve  $10^{-11}$ . Foram retiradas 3 amostras de cada uma das 12 concentrações e incubadas em meio BDA, utilizando-se placas de Petri com dimensões de 92 mm de diâmetro por 14 mm de altura, que foi distribuída com auxílio de alça de Drigalski e mantidas em câmara BOD, temperatura de 27 °C, fotoperíodo 12:12. As amostras foram contadas após 48 horas. Após obtenção do resultado para padrão de contagem, foi inicializado a segunda parte de trabalho.

Na segunda parte do trabalho, foram pesados 10 gramas de cultura de *Metarhizium anisopliae* e posteriormente colocados em 100 ml de Solução Tween 80 (em diluição de 0,1% em água ultra purificada), onde então o arroz+fungo foi lavado por 15 minutos, utilizando-se um agitador magnético. Em seguida, após a obtenção desta solução-mãe, foi diluído 10 ml desta em 90 ml de Solução Tween 80, obtendo-se uma solução  $10^{-1}$  e em seguida, foi repetido procedimento até que foi obtida uma solução  $10^{-4}$  em referência à solução mãe.

Ao obter-se a solução na concentração  $10^{-4}$ , foi considerada a solução do instante inicial (instante zero) e a *posteriori* semeado 100  $\mu$ L em placa de petri de 92 mm de diâmetro por 14 mm de altura, utilizando-se meio BDA. A semeadura de cada réplica foi realizada em ambiente esterilizado, utilizando-se fluxo laminar. As amostras foram disseminadas homoganeamente, utilizando-se alça de Drigalski, previamente flambadas, até que obtinha-se seu resfriamento, no entanto sem retirar do ambiente estéril.

A partir do instante 0, amostras de 100  $\mu$ L desta mesma diluição, foram semeadas subsequentemente em intervalos de duas horas, em três replicas até que atingiu 72 horas (3 dias). Cada amostra de 3 réplicas, obtida em intervalo de 2 horas, foi acondicionada em câmara BOD; em temperatura de 27 °C; fotoperíodo de 12:12, juntamente com a solução do instante inicial, a qual era então previamente agitada por 2 minutos em agitador magnético, antes da retirada de cada amostra.

Foi retirada uma amostra da solução Tween no instante inicial e semeado no meio BDA, sendo considerada como controle.

As amostras foram observadas após 48 horas após semeadura, momento em que foram contadas as UFCs, utilizando-se um contador manual das três réplicas para cada período amostral de 2 horas.

Os dados foram posteriormente planilhados no Programa Minitab 10.1 (1994) e analisados em Regressão Polinomial de três fatores, conforme Zar (1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que para contagem das colônias, a melhor concentração ocorreu na diluição de  $10^{-4}$ , em relação à diluição inicial, dado que nesta diluição obteve-se o crescimento médio de 54 UFCs por placa. A indicação para melhor visualização e contagem das colônias foi evidenciada na diluição  $10^{-4}$ , onde foi constatado o crescimento de 41 a 64 UFCs. Tal valor, está em conformidade com a Instrução

Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003, a qual instrui que o número para contagem de colônias para Fungos e Bolores está fixado entre 15 a 150 UFCs. (BRASIL, 2003).

Estabeleceu-se colônias crescendo de forma unificadas na diluição  $10^{-4}$ , sendo portanto mais fácil sua contagem em placas com diâmetros próximos a 10 cm, pois após o crescimento, as UFCs estavam separadas, sendo possível sua contagem de maneira individualizada. Os resultados desta abordagem estão mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Número de UFCs (Unidade Formadoras de Colônias) e Média de contagem, conforme concentrações de esporos de *Metarhizium anisopliae*, distribuídas em Placas de Petri com 92 mm de diâmetro.

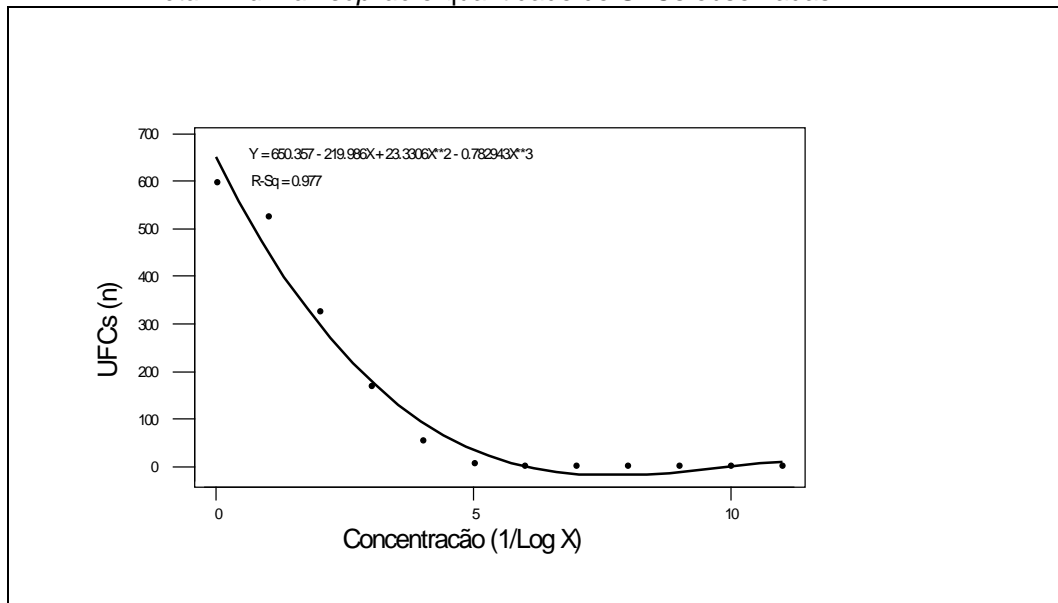
Concentrações	Replica 01	Replica 02	Replica 03	Média
1 <sup>(0)</sup>	695	519	579	597,6667
10 <sup>(-1)</sup>	552	538	489	526,3333
10 <sup>(-2)</sup>	310	297	372	326,3333
10 <sup>(-3)</sup>	167	165	172	168
10 <sup>(-4)</sup>	41	64	57	54
10 <sup>(-5)</sup>	2	11	4	5,666667
10 <sup>(-6)</sup>	2	0	1	1
10 <sup>(-7)</sup>	2	0	0	0,666667
10 <sup>(-8)</sup>	0	0	0	0
10 <sup>(-9)</sup>	0	0	0	0
10 <sup>(-10)</sup>	1	0	0	0,333333
10 <sup>(-11)</sup>	0	0	0	0

Os valores mostrados na Tabela 1 foram transformados em  $1/\text{Log}X$  e planilhados no Programa estatístico Minitab (versão 10.1), onde foi realizada uma análise de regressão polinomial de 3 fatores.

Verificou-se  $F=112,895$  ( $p= 0,000000691$ ;  $p<0,001$ ), indicando que houve uma alta correlação entre o número de UFCs obtidos nas placas, conforme concentrações testadas e foi na concentração de  $10^{-4}$  que se obteve o número médio de UFCs, conforme pode ser verificado na Figura 1.

Verificou-se também, um valor de  $r^2$  muito significativo para a curva estimada da regressão polinomial, observando um valor próximo a 1,00 ( $r^2 = 0,991$ ), indicando portanto, que os valores estimados pela curva de Regressão Polinomial estão muito próximos dos valores observados no experimento.

**Figura 1.** Regressão Polinomial realizada entre a Concentração de esporos (1/LogX) de *Metarhizium anisopliae* e quantidade de UFCs observadas.



Após estabelecido a diluição a ser utilizada no experimento, foram iniciadas as amostras, nas quais foram retiradas 3 réplicas de uma diluição  $10^{-4}$ , sendo que na primeira amostra (A-1), considerou-se o instante inicial (tempo 0) e as demais amostras foram realizadas em intervalos de 2 horas, até que atingiu-se 72 horas após a diluição dos esporos em solução de Tween 80 (a 0,1 %) em água ultra pura, sendo que em cada réplica foi semeado 100  $\mu$ L da diluição. Os valores obtidos nas três réplicas conforme amostras de intervalos de 2 horas, assim como as médias calculadas e consideradas no experimento, estão presentes no Quadro 1.

A amostra controle foi realizada a partir do instante 0 e observada após 72 horas, sendo que nesta, também foi disponibilizado somente 100  $\mu$ L de solução de Tween 80 por placa diluída em água ultra pura, sem os esporos.

A média calculada entre as amostras foi planilhada em Programa estatístico, conforme o horário após diluição. A regressão realizada entre horas após a diluição dos esporos e número de UFCs semeadas em placas, mostrou a curva calculada conforme a seguinte equação polinomial:

$$Y = 154.746 - 3.21595X + 1.41E-02X^{**2} + 8.97E-05X^{**3}$$

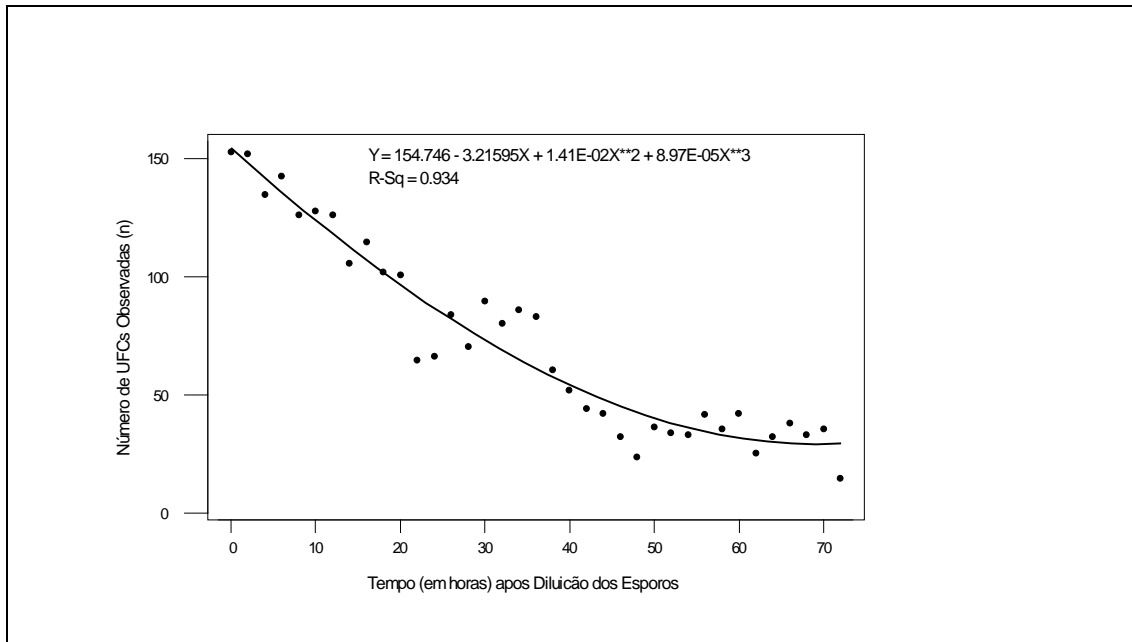
**Quadro 1.** Valores obtidos de UFCs de *Metarhizium anisopliae*, conforme amostras realizadas em intervalos de 2 horas, durante o período total de 72 horas.

Amostra	Tempo	Replica 01	Replica 02	Replica 03	Média
A-1	0	149	157	153	153
A-2	2	162	137	158	152,3333
A-3	4	116	133	156	135
A-4	6	136	153	139	142,6667
A-5	8	129	134	116	126,3333
A-6	10	122	129	133	128
A-7	12	119	131	129	126,3333
A-8	14	103	117	98	106
A-9	16	114	119	112	115
A-10	18	124	93	89	102
A-11	20	111	103	89	101
A-12	22	67	58	69	64,66667
A-13	24	73	64	63	66,66667
A-14	26	89	72	91	84
A-15	28	63	87	62	70,66667
A-16	30	81	86	102	89,66667
A-17	32	86	69	86	80,33333
A-18	34	87	84	87	86
A-19	36	85	114	51	83,33333
A-20	38	60	64	58	60,66667
A-21	40	51	52	53	52
A-22	42	38	52	43	44,33333
A-23	44	43	33	51	42,33333
A-24	46	30	37	30	32,33333
A-25	48	25	27	19	23,66667
A-26	50	28	38	43	36,33333
A-27	52	43	28	31	34
A-28	54	38	35	27	33,33333
A-29	56	54	34	37	41,66667
A-30	58	36	46	25	35,66667
A-31	60	41	56	30	42,33333
A-32	62	35	17	24	25,33333
A-33	64	36	29	32	32,33333
A-34	66	39	37	39	38,33333
A-35	68	30	36	34	33,33333
A-36	70	35	38	34	35,66667
A-37	72	19	11	14	14,66667
Controle	0	0	0	0	0

A análise de regressão mostrou  $F=154,620$  (com  $p<0,001$ ), mostrando portanto alta significância. Além disso, os valores estimados para a curva, pontuadas de acordo com a referida equação polinomial, mostrou um valor para  $r^2$  igual a 0,934, conforme mostra a Figura 2.

Conforme estimativa da curva e dados apontados no Quadro 1, verifica-se que após a 36<sup>a</sup> hora após a diluição, a viabilidade dos esporos caem abaixo de 50%; não sendo indicado portanto o uso após este momento, visto que na 36<sup>a</sup> hora foi observada média de 83,33 UFCs, enquanto na 38<sup>a</sup> hora cai para média de 60,666 UFCs e caindo potencialmente nas amostras realizadas *a posteriori*.

**Figura 2.** Regressão Polinomial realizada entre o tempo após a diluição de  $10^{-4}$  de *Metarhizium anisopliae* em solução de Tween 80 e a quantidade de UFCs observadas em placas de Petri de 92 mm de diâmetro.



Considerando que a média inicial foi de 153 UFCs (100 %), os valores observados para as médias de UFCs além da 36<sup>a</sup>, são inviáveis, pois caem pela metade após este intervalo de tempo.

## CONCLUSÃO

Pelo exposto, conclui-se que a viabilidade dos esporos cai abaixo de 50%, a partir de 36 horas após realizada sua diluição em solução de água ultrapura + Tween 80 (a 0,1%), não indicando portanto seu uso após este período.

## REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ARRIGONI, E.B. **Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas: Pragas de Solo**. In: Manual do VII Workshop Tecnológico sobre Pragas da Cana-de-Açúcar. Piracicaba: ESALQ, 2007.

BRASIL – Ministério da Agricultura. **Cana de açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 de Agosto de 2014, 01H:25min.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 62, DE 26 DE AGOSTO DE 2003**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2003.



CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**. Brasília: CONAB, 2014

FRANCESCHINI, M. et al. O entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, D.F., v. 23, p. 32-37, 2001.

GARCIA, M.V; **Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* em pastagem visando o controle do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos**. Jaboticabal, 2008. 58 f. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal.

LOUREIRO, E.S. et al. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), em condições de campo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, S.P., v. 79, p. 47-53, 2012.

MINITAB FOR WINDOWS (RELEASE 10.1). **User's guide**. Enterprise Drive St. Cl. Pensylvania – USA.1994.

NASCIMENTO, F.S.B. **Ação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* e parâmetros biológicos após passagem em *Rhipicephalus sanguineus***. Recife, 2003. 71 f. [Dissertação de Pós-graduação]. Universidade Federal de Pernambuco.

TIAGO, P.V; SILVA, R.J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não-cuticulares. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria – RS., v. 37, p. 26-37, 2007.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**.4. ed. Prentice Hall. New Jersey. 661 p., 1999.