

SOBREVIVÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN  
(LINHAGEM PL43) EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR<sup>1</sup>

Sônia M. A. Ribeiro<sup>2</sup>, Elza A. de L. Alves-Lima<sup>2,3</sup> e  
Wilma T. G. de Assunção<sup>2</sup>

ABSTRACT

Survival of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin  
(strain PL43) in leaves of sugarcane.

The strain PL43 of the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* was isolated from *Mahanarva posticata* (Stal) and was put to grow in culture medium of potato dextrose agar (PDA), that was purified and from which it was obtained monosporic culture. The fungus life cycle was completed on the host species at the eight day of his growth and, in culture medium, at the fifteenth day. At field experiment, conidia viability, was observed on the upper leaves, until the tenth day and, on the lower ones, until the fourteenth day. This fact shows endurance on the leaves and its resistance to the sunlight. KEYWORDS: *Metarhizium anisopliae*; survival; sugarcane.

RESUMO

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* linhagem PL43 foi isolado de *Mahanarva posticata* (Stal), crescido em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), purificado e obtida cultura monospórica. O ciclo de vida do fungo no inseto foi completado aos 8 dias de crescimento e em meio de cultura aos 15 dias. No experimento de campo, a viabilidade dos conídios nas folhas superiores foi observada até aos 10 dias e, nas folhas inferiores até aos 14 dias, mostrando a persistência aos raios solares. PALAVRAS-CHAVE: *Metarhizium anisopliae*; sobrevivência; cana-de-açúcar.

Recebido em 18/03/91

<sup>1</sup> Parte da Tese de Mestrado apresentada pelo 1º autor à UFPE, Recife, outubro/1990.

<sup>2</sup> Departamento de Micologia UFPE, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n 50740-520 Recife PE.

<sup>3</sup> Apoio financeiro do CNPq. Proc. 301349/87-8 (Pesquisa).

## INTRODUÇÃO

O fungo *M. anisopliae* é bastante eficiente no controle microbiano de insetos. Os primeiros trabalhos de aplicação de *M. anisopliae*, no controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar, no Brasil tiveram início no Nordeste, nos Estados de Pernambuco, Sergipe e Bahia (GUAGLIUMI, 1968; 1970; 1971; 1972; MARQUES & VILLAS BOAS, 1973).

Apesar da importância desse patógeno, são escassas as informações existentes sobre a ação dos fatores ambientais, no que se refere a capacidade de persistência desse fungo no campo (ALVES *et al.*, 1984; DAoust & PEREIRA, 1986).

Diversos autores (IGNOFFO *et al.*, 1977; OKINO *et al.*, 1978; IGNOFFO *et al.*, 1979; CORRÊA, 1982) têm demonstrado que fontes artificiais de radiação solar são prejudiciais à estabilidade dos conídios de *M. anisopliae* e de outros fungos.

O presente trabalho objetivou verificar a sobrevivência de conídios aplicados em plantas de cana-de-açúcar em condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citologia e Genética do Departamento de Micologia do CCB/UFPE, no Setor de Entomologia e no Campo da Estação Experimental do IAA/PLANALSUCAR, Carpina-PE.

A linhagem utilizada foi a PL<sub>43</sub> de *M. anisopliae* obtida da coleção de cultura, do Setor de Entomologia do IAA/PLANALSUCAR e isolada de adultos de *Mahanarva posticata* (Stal).

Para crescimento, purificação e obtenção de cultura monospórica foi usado o meio batata-dextrose-ágar (BDA). E para a produção de inóculos utilizou-se o substrato arroz do tipo parboilizado cozido, em sacos de polipropileno de 2 kg, contendo em cada saco 200 g de arroz e 100 ml de água destilada, autoclavado a 120°C, durante 15 minutos, onde foram inoculados 10 ml de uma suspensão contendo  $1 \times 10^8$  conídios/ml.

### Revigoreamento da linhagem

O revigoreamento foi feito, partindo-se de cultura em BDA com 15 dias de crescimento. Em Erlenmeyer contendo 100 ml de solução de Extravon foram colocados conídios na concentração de  $10^8$  por mililitro. Adultos de *M. posticata* foram pulverizados com esta suspensão.

Em copos de vidro com capacidade para 200 ml, foram colocados na parte inferior papel filtro, umedecido e sobre este, pedaços de colmo da parte superior da cana-de-açúcar, que serviram de alimento. Em cada um desses copos foram colocados dois adultos de cigarrinhas, inoculados previamente.

Foram feitas observações diárias até se detectar os primeiros sinais de infecção. As cigarrinhas mortas foram individualizadas em caixas de plástico com 6 cm de diâmetro, por 2,5 cm de altura, contendo papel filtro umedecido. Diariamente foram efetuadas revisões e colocadas gotas de água para a manutenção da umidade necessária ao desenvolvimento do fungo.

Após 15 dias de inoculação do fungo, o mesmo foi isolado e purificado em meio de cultura BDA + Cloranfenicol.

Esse revigoramento foi realizado em laboratório a 28°C de temperatura ambiente.

#### Porcentagem de viabilidade dos conídios

A viabilidade dos conídios foi obtida espalhando-se com alça de Drigalsky 0,1 ml da suspensão de conídios, em toda a superfície da placa de Petri, contendo meio de cultura BDA + Cloranfenicol. Após 18 horas foi efetuada a leitura diretamente ao microscópio contando-se 500 conídios por placa, em três placas usando-se o contador de duas teclas. Foram contados vários campos na mesma placa, e em cada campo focalizado, contados os conídios germinados e não germinados em faixas, correspondendo ao diâmetro vertical e horizontal do campo. O conídio germinado para efeito de contagem foi aquele, cujo tubo germinativo se apresentou maior que um terço do tamanho do conídio.

O cálculo efetuado foi o seguinte:

Em 1500 conídios = n germinados

100 = G

$$G = \frac{n \times 100}{1500} = \% \text{ de germinação}$$

#### Experimento de campo

A técnica utilizada para o experimento de campo foi a mesma desenvolvida por ALVES *et al.*, (1984). Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar variedade SP 701143, com 60 cm de altura, localizadas numa área plana de 20 m de comprimento, contendo 5 linhas de sulcos com espaçamento de 1,20 m totalizando 120 m<sup>2</sup>.

Para a aplicação da suspensão contendo  $2,5 \times 10^8$  conídios/ml da linhagem PL43 de *M. anisopliae* mais espalhante adesivo usou-se um pulverizador manual.

De cada folha superior e inferior pulverizada foram retiradas com um vazador de 1,5 cm<sup>2</sup>, 2 amostras da base, 2 do meio e 2 da ponta, totalizando 6 amostras das folhas superiores e 6 amostras das folhas inferiores. Esse procedimento foi feito em triplicata.

As amostras das folhas foram lavadas com água destilada autoclavada, sendo uma parte dessa água espalhada em placa de Petri com BDA + Cloranfenicol, onde foram preparadas 3 placas para cada tratamento, determinando-se a porcentagem de viabilidade dos conídios.

### **Análises estatísticas**

O estudo da viabilidade dos conídios foi feito, segundo CORDEIRO (1986). Seguiu-se a análise de probites através dos modelos lineares generalizados, que trataram os mesmos de forma encaixada, a qual foi construída por acréscimo, a um modelo inicial onde se testa este acréscimo, segundo a equação:

$$y = a - \beta x.$$

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Revigoramento da linhagem**

As cigarrinhas apresentaram total redução de atividades 72 horas após a aplicação de *M. anisopliae*. Aos 5 dias, os insetos mortos, colocados em câmara úmida, mostraram sinais de infecção e apresentaram uma camada branca filamentosa, que se externava através dos metâmeros do corpo do inseto. Após 8 dias, as cigarrinhas apresentaram coloração esverdeada em decorrência da elevada produção de conídios.

### **Porcentagem de viabilidade de conídios**

Os resultados dos testes de viabilidade dos conídios localizados nas folhas superiores e inferiores da cana-de-açúcar, durante o intervalo de aplicação de 3 a 360 horas, encontram-se sumarizados no Quadro 1.

Com base nos resultados de viabilidade dos conídios foi possível determinar-se para a linhagem PL43 que nas condições experimentais de campo, o trabalho foi realizado numa umidade relativa média de 65,6%, temperatura média de 28,3°C, sem precipitação pluviométrica e radiação global média de 407,3 cal/cm<sup>2</sup>/min.

Para os conídios localizados nas folhas superiores após 24 horas de exposição foi verificado 85,3% de sobrevivência e após 96 horas foi obtido 60,3%, observando-se até às 240 horas o percentual de 3,0% de conídios viáveis. Esses dados discorriam com os resultados obtidos por ALVES *et al.* (1984), os quais estudaram a viabilidade dos conídios da linhagem Eg de *M. anisopliae*, em condições de umidade e temperatura mais baixas, onde observaram uma menor sobrevivência dos conídios.

Para os conídios localizados nas folhas inferiores foi notado maior tempo de sobrevivência às 336 horas, em decorrência da menor exposição à radiação solar. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por DAOUST & PEREIRA (1986), quando expuseram conídios de *M. anisopliae* à sombra sobre raízes de taiuíá e verificaram 30,3% de viabilidade às 336 horas. Contudo, nenhum conídio viável foi detectado, quando a exposição foi feita diretamente aos raios solares.

Os resultados do experimento de campo mostraram a tolerância do fungo aos raios solares, o que comprova a eficiência da linhagem PL43 no controle de *M. posticata*.

### Análise estatística

Para as folhas superiores, o modelo  $y = a + bx$  foi significativo em relação ao modelo  $y = a$  ao nível de significância de 5%. A diferença da "Deviance" foi de 3438 a 1 grau de liberdade, que comparado com  $X^2_{1,5\%} = 3,84$ , foi maior.

As estimativas de  $\alpha$  e  $\beta$  com o respectivo desvio-padrão estão sumarizados no Quadro 2.

Para as folhas inferiores, o modelo  $y = \alpha - \beta x$  foi significativo em relação ao modelo  $y = \alpha$  ao nível de significância de 5%. A diferença da "Deviance" foi 2.698 a 1 grau de liberdade, que comparado com  $X^2_{1,5\%} = 3,84$  foi maior.

As estimativas de  $\alpha$  e  $\beta$  com o respectivo desvio-padrão, estão evidenciados no Quadro 3.

Empregou-se para as folhas superiores, a seguinte equação:

$$\emptyset^{-1} (P(x)) = 1,548 + 0,0145x$$

e para as inferiores:

$$\emptyset^{-1} (P(x)) = 1,873 + 0,01013x$$

Os Quadros 4 e 5 indicam os resultados da análise estatística da sobrevivência de 10, 50 e 90% dos conídios, sobre as folhas superiores e inferiores da cana-de-açúcar.

QUADRO 1 - Percentagem de viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* nas folhas da cana-de-açúcar

HORA	VIABILIDADE DE CONÍDIOS							
	Folhas		Superiores		Folhas		Inferiores	
	I	II	III	Média	I	II	III	Média
03	97	98	100	98,3	100	100	100	100,0
06	95	94	98	95,6	100	98	100	99,3
24	83	82	91	85,3	98	92	98	96,0
48	72	74	80	75,3	86	89	92	89,0
72	62	67	70	66,3	78	81	85	81,3
96	60	58	63	60,3	62	70	78	72,0
120	20	36	46	37,0	65	69	71	68,0
144	10	30	28	25,6	58	63	67	62,6
168	18	30	15	21,0	54	60	62	58,6
192	16	25	15	18,6	54	53	58	55,0
216	7	9	2	6,0	46	50	55	50,0
240	4	6	0	3,0	32	50	36	39,3
264	0	0	0	0,0	29	25	36	30,3
188	0	0	0	0,0	21	9	13	14,3
312	0	0	0	0,0	5	4	4	4,3
336	0	0	0	0,0	2	0	1	1,0
360	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0

QUADRO 2 - Estimativas e desvio-padrão calculados para as folhas superiores

	Estimativas	Desvio-padrão
$\alpha$	1,548	0,04704
$\beta$	-0,0145	0,00036

$R^2 = 97,72\%$ .

QUADRO 3- Estimativas e desvio-padrão calculados para as folhas inferiores

	Estimativas	Desvio-padrão
$\alpha$	1,873	0,0468
$\beta$	-0,01013	0,00023

$R^2 = 95,04\%$ .

QUADRO 4 - Sobrevivência dos conídios de *M. anisopliae* pulverizados nas folhas superiores da cana-de-açúcar

PERCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA	TEMPO (HORA)	I.C. (x) 95%*
10	195,03	[188,58; 201,48]
50	106,75	[103,18; 110,33]
90	18,48	[ 13,80; 23,26]

\* I.C. (x) = intervalo de confiança para horas.

QUADRO 5 - Sobrevivência dos conídios de *M. anisopliae* pulverizados nas folhas inferiores da cana-de-açúcar

PERCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA	TEMPO (HORA)	I.C. (x) 95%*
10	311,25	[304,01; 318,49]
50	184,89	[180,57; 189,23]
90	58,53	[ 53,79; 63,27]

\* I.C. (x) = intervalo de confiança para horas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao IAA/PLANALSUCAR-Carpina - PE, na pessoa do Coordenador Edmilson Jacinto Marques, pelo uso das instalações para a realização do trabalho de campo. Aos colegas Rejane Martins de Andrade e Jaime José de Paula, pela valiosa ajuda na execução de toda parte experimental. Ao meteorologista José Félix de Santana, pela eficiente elaboração dos dados meteorológicos. Ao Prof. Gabriel Rivas de Melo, da UFRPE pelas análises estatísticas.

## LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L. 1984. Capacidade de sobrevivência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (isolado Eg) sobre cana-de-açúcar, nas condições de campo. *Solo* 76:39-42.
- CORDEIRO, G.M. 1986. *Modelos lineares generalizados*. (Campinas, Unicamp, livro texto do VII Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística) p.21-31.
- CORRÊA, G.S. 1982. Influência da radiação ultravioleta na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no solo. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico* 3: 8-9.
- DAOUST, R.A. & PEREIRA, R.M. 1986. Survival of *Beauveria bassiana* (Deteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pest stored outdoors and in laboratory in Brazil. *Environ. Ent.* 15:642-647.
- GUAGLIUMI, P. 1968. As cigarrinhas dos canaviais (Hom. Cercopidae) no Brasil. 1ª contribuição: Perspectivas de uma luta biológica contra *M. indicata* nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Brasil Açucareiro* 72:34-43.
- GUAGLIUMI, P. 1970. A cigarrinha das pastagens ataca a cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. *Brasil Açucareiro* 76:89-91.
- GUAGLIUMI, P. 1971. Lucha integrada contra las "cigarrinhas" (Hompt.: Cercopidae) en el Nordeste del Brasil. IN CONGRESO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, Cusco-Peru, p.361-368. *Anais*
- GUAGLIUMI, P. 1972. Resultados preliminares na luta biológica contra a cigarrinha da folha e da cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco. *Brasil Açucareiro* 80:49-51.



- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; ALYOSHINA, O.A.; LAPPA, N.V. 1979. Laboratory and field studies with Boverin: a mycoinsecticidal preparation of *Beauveria bassiana* produced in the Soviet Union. *Invertebr. Pathol.* 72:562-565.
- IGNOFFO, C.M.; HOSTETLER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M. 1977. Inactivation of representative species protozoan by and ultraviolet light source. *Environ. Ent.* 6: 411-415.
- MARQUES, E.J. & VILAS BOAS, A.M. 1973. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata* Stal.) no Nordeste do Brasil. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL, 1, Viçosa, p. 70. *Anais*.
- OKINO, L.A.; SILVA, J.C.; SANTOS, A.L.L.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. 1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *Solo* 70:32-36.