

## **PERSISTÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* spp NO SOLO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE.**

*Diana Mendonça Silva Guerra*

Departamento de Micologia - Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco.  
E-mail: diguerra04@bol.com.br

*Ana Paula Duarte Pires*

Doutora em Biologia de Fungos, área de concentração citologia-genética e controle biológico  
E-mail: anapduarte@hotmail.com

*Elza Áurea de Luna Alves Lima*

Departamento de Micologia - Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco.  
E-mail: ealal@bol.com.br

**RESUMO:** - Os fungos entomopatogênicos são atualmente objetivos de trabalhos devido a sua grande importância no ecossistema. Este trabalho avaliou a persistência no solo de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, sob diferentes condições de temperatura e umidade, no período de setembro a dezembro. Após inoculação no solo os fungos foram submetidos a quatro tratamentos distintos: temperatura ambiente e 25% de umidade; temperatura ambiente e 75% de umidade; 28°C e 25% de umidade; 28°C e 75% de umidade, durante 120 dias. Os resultados demonstraram que *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou maior recuperação no tratamento 28°C e 75% de umidade ( $P > 0,05$ ) aos 30 dias e persistiu viável no solo durante os 120 dias do experimento. O mesmo não ocorreu com *M. anisopliae* var. *acridum* quando, durante todo período de observação não propiciou recuperação de colônias inviabilizando a sua persistência no solo, durante todo o período do experimento.

**Palavras-chave:** fungos entomopatogênicos, fatores abióticos.

## **PERSISTENCE OF *Metarhizium anisopliae* spp IN SOIL UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF TEMPERATURE AND HUMIDITY**

**ABSTRACT** - The fungi entomopathogenic are actually objects of works according to their importance in the ecological system. This work analysed the persistence of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *acridum*, under different conditions of temperature and humidity, in the period of September to December. After inoculation on soil the fungi were submitted to four different treatments: environment temperature and 25% of humidity; environment temperature and 75% of humidity; 28° C and 25% of humidity; 28° C and 75% of humidity, during 120 days. The results show that *M. anisopliac* var. *anisopliae* presented the most recuperation in the treatment at 28° C and 75% of humidity ( $P > 0,05$ ) in 30 days and maintained a positive conditions on soil for 120 days of experiment. The same did not happen to *M. anisopliae* var. *acridum* that, during the whole process of observation and controll the colonies recuperation avoiding its persistence on soil, during the 120 days of experiment.

**Key words:** entomopathogenic fungus, abiotic factors.

### **INTRODUÇÃO:**

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos os fungos. Destes, cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies estão relacionadas às patologias de insetos. A maioria dos fungos entomopatogênicos já relatados ocorre no Brasil, sendo que, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1998; LEITE *et al*, 2003; MENDONÇA, 2005). No Brasil se utiliza *M. anisopliae*, para controlar as populações de insetos-praga, de importância médica, veterinária e agrícola. Para esse fim *M. anisopliae* é apontado como um agente de controle biológico de grande potencialidade.

Em nosso País, vem sendo utilizado com sucesso contra cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) e das pastagens (*Zulia entreriana* e *Deois flavopicta*) (FARIA *et al.*, 2002; LEITE, *et al.*, 2003). *M. anisopliae* var. *acridum* (DRIVER *et al.*, 2000) está sendo aplicado como bioinseticida em alguns países africanos, para o controle de gafanhotos mas pouco se conhece sobre os aspectos biológicos deste fungo. Dessa maneira apesar da importância dos fungos entomopatogênicos para a agropecuária, pouco tem sido realizado em relação ao seu potencial no solo, no que se refere aos estudos abióticos (MAGALHÃES *et al.*, 2000).

VÄNNINEN *et al.* (2000) avaliaram a persistência de conídios de *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* na superfície de solo argiloso no período de 1988-1991, em

condições caracterizadas pela presença de neve permanente durante o inverno. Constataram que após três anos da aplicação do inoculo os propágulos de *M. anisopliae* permaneceram ativos, o mesmo não aconteceu com os de *B. bassiana*, que desapareceram.

As condições ambientais exercem grande influência para esses agentes fúngicos, sendo estas adversas, o controle microbiano torna-se prejudicado, justificando-se as pesquisas, visando selecionar, induzir e melhorar linhagens de patógenos que apresentam características úteis para o êxito de seu emprego no campo. Os fatores ambientais interferem na germinação, esporulação e virulência, sendo os principais a temperatura, a umidade, a luz e o pH (BLANFORD & THOMAS, 2001).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a persistência de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* no solo, sob diferentes condições de temperatura e umidade.

## MATERIAL E MÉTODOS:

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens: *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* PL<sub>43</sub> isolada de *Mahanarva posticata*, Brasil, cedida pela Micoteca- URM (University of Recife-Mycolgia), e *M. anisopliae* var. *acridum* CG423 isolada de *Schistocerca pallens*, Brasil, cedida pela EMBRAPA/CENARGEN (“Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias/Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia”) Brasília – Distrito Federal.

Foi utilizado no experimento solo oriundo do Engenho Rosário, Município do Cabo-PE, Terra Roxa Estruturada Álica a moderado textura muito argilosa fase floresta tropical subperenófila relevo ondulado. Quanto às propriedades químicas, são solos ricos em ferro (21 a 24%, ácidos com pH em água entre 4,9 e 5,0), com baixa saturação de bases e alta saturação com alumínio extraível no horizonte B, sendo as argilas de atividade baixa. Coletado a 5cm de profundidade e tratado segundo o método “Terra Fina Seca ao Ar” (T.F.S.A.) (Manual de

Métodos de Análise de Solo, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1979).

Para estudar os efeitos da temperatura e do conteúdo de água sobre os fungos no solo, o trabalho foi desenvolvido à temperatura ambiente ( $31 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  (BOD) e a percentagem de saturação de água de 25% e 75% em solo esterilizado. Foi determinado para cada 700 gramas de solo a adição de 0,35 gramas de conídios de *M. anisopliae* var. *anisopliae* que correspondem a  $5 \times 10^5$  conídios/g de solo e 0,13 gramas de conídios de *M. anisopliae* var. *acridum* que correspondem a  $5 \times 10^5$  conídios/g de solo. Cada tratamento correspondeu a combinação de diferentes temperaturas e da percentagem de saturação, com três repetições.

O experimento foi realizado no período de setembro a dezembro. Para manutenção da umidade, os recipientes foram pesados e sempre que necessário, adicionado água destilada autoclavada. A avaliação dos fungos no solo, foi realizada aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias após inoculação, foi coletado uma amostra correspondente a 10g de solo seco de cada repetição. Das amostras coletadas foram efetuadas suspensões a partir de uma suspensão mãe a 10% da qual foram feitas sucessivas diluições ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ). De cada diluição 0,1mL foi colocado em placas meio seletivo (BDA+Dodine) em três repetições por diluição; para a primeira avaliação, nas demais placas foi utilizada a diluição  $10^{-4}$ . Em seguida as placas foram incubadas em BOD e a temperatura ambiente durante 9 dias, quando foi efetuada a contagem das colônias. Para cada parâmetro avaliado, utilizou-se a análise de variância e para a comparação entre as médias, realizou-se o teste de Tukey a 5% de significância, e um estudo da persistência do fungo no solo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos referentes ao número médio de colônias de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (média de três repetições) recuperadas do solo, após a inoculação nos vários períodos testados encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Número médio de colônias de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* recuperadas do solo, em diferentes tratamentos e dias de observação

Dia/Tratamento	T <sub>1</sub> U <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> U <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> U <sub>2</sub>
0	10,90 a	10,90 a	7,60 a	7,60 a
30	2,99 b	4,29 b	2,77 b	4,73 b
60	0,57 c	1,96 c	1,09 c	2,39 c
90	0,35 c	0,91 c	1,24 bc	1,64 c
120	0,27 c	0,73 c	2,68 b	3,29 bc

CV = 20,87%

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5%. T<sub>1</sub> - Temperatura ambiente T<sub>2</sub> -  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  U<sub>1</sub>- 25% de umidade U<sub>2</sub>- 75% de umidade

Na Tabela 2 está expresso o percentual de recuperação de colônias de *M. anisopliae* var. *anisopliae* em relação ao dia 0 (início do experimento).

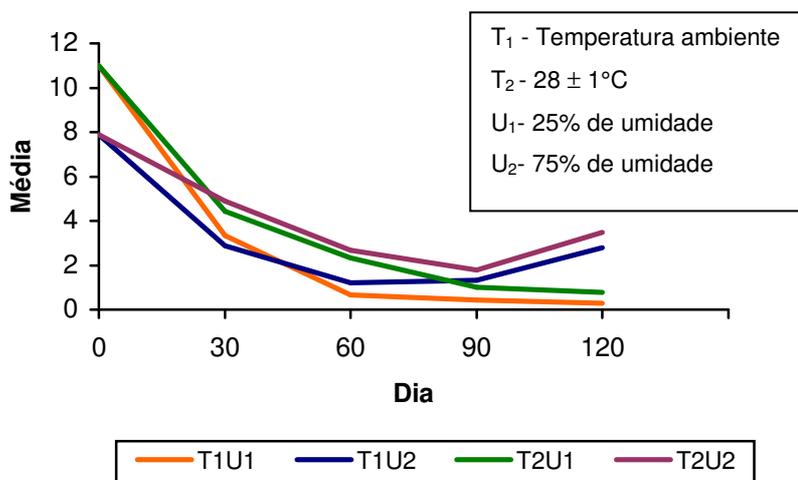
**Tabela 2.** Percentual de recuperação de colônias de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, dos tratamentos estudados, nos vários dias de observação em comparação ao dia zero

Dia/Tratamento	T <sub>2</sub> U <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> U <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> U <sub>1</sub>
30	62%	36%	39%	27%
60	31%	14%	18%	05%
90	21%	16%	08%	03%
120	43%	35%	06%	02%

T<sub>1</sub> - Temperatura ambiente; T<sub>2</sub> - 28 ± 1°C ; U<sub>1</sub>- 25% de umidade; U<sub>2</sub>- 75% de umidade

Em termos percentuais o efeito da temperatura não alterou significativamente o resultado, ao se variar a umidade, o percentual de recuperação das colônias de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* foi bastante significativo, no qual, para a umidade de 75% foi observado uma variação de 35% a 43% e a 25% de 2% a 6%, o número de colônias recuperadas do solo, aos 120 dias em relação ao dia zero. Pode-se observar o efeito da temperatura e da percentagem de saturação da água sobre a persistência de *M. anisopliae* var. *anisopliae* no solo. Para os níveis constantes de 25% e 75% de saturação verificou-se que a temperatura controlada de 28 ± 1°C mantém um número maior de colônias do fungo, estes achados estão de acordo com LINGG & DONALDSON (1981) quando avaliaram a sobrevivência de *Beauveria bassiana* no solo e verificaram que foi primariamente dependente da temperatura e do conteúdo da água; onde os esporos mantidos em altas temperaturas não foram recuperados em nenhuma das umidades testadas; também MAGALHÃES *et al.* (1993) trabalharam com micélio seco de *M. anisopliae* durante a conidiogênese, confirmaram que a temperatura ótima para a esporulação foi obtida aos 28°C. Os efeitos da temperatura são muito importantes pois, servem de parâmetros biológicos para as pesquisas sobre formulação. Neste sentido MARQUES *et al.* (1999) efetuaram estudos com micélio seco de *M. anisopliae* e *B. bassiana* submetidos às várias

temperaturas e constataram que a 25 ± 1°C, as formulações com Alginato de Sódio aos 15 dias de estocagem foram mais produtivas e aos 30 dias a formulação com *M. anisopliae*, ainda estava inviável. Ao analisar o efeito da umidade constatou-se, ainda, que a 25% houve um declínio no número de colônias que se manteve até os 120 dias. A 75% houve um declínio até os 90 dias; porém, aos 120 dias o número de colônias foi superior aos 60 e 90 dias. Esses resultados sugerem o desenvolvimento do patógeno no solo; no entanto, WALSTAD *et al.* (1970) consideram improvável o crescimento de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em abundância como sapróbio no solo, uma vez que o desenvolvimento do seu ciclo biológico também depende de uma fase parasitária no hospedeiro. Os trabalhos sobre os fatores abióticos estão mais relacionados com a temperatura. No trabalho ora desenvolvido os resultados demonstraram que a temperatura controlada de 28°C foi a mais eficiente para a persistência do fungo no solo. Os estudos de sobrevivência, persistência e estabilidade no solo são relevantes para a compreensão da ecologia desse agente, na sua função de controlador microbiano de pragas (LINGG & DONALDSON, 1981; FARGUES & ROBERTS, 1985 & ALVES, 1998). A persistência do *M. anisopliae* var. *anisopliae* no solo, foi mantida durante todo o período do experimento que correspondeu a 120 dias, nas diferentes condições como mostra a Figura 1.



**Figura 1.** Persistência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* no solo, em diferentes condições de temperatura e umidade.

Os estudos sobre a persistência do fungo no solo são considerados importantes por darem subsídios para o desenvolvimento destes e de outros fungos para uso no Controle Integrado de Pragas. Sendo assim INYANG *et al.* (2000) estudaram a persistência de *M. anisopliae*, em formulações de água e de óleo e concluíram que o desenvolvimento epizootico induzido pelo fungo, depende não somente da relação entre a densidade da população do inseto alvo e da quantidade do inóculo, mas também do tipo de formulação utilizada.

O maior índice de recuperação de colônias foi apresentado aos 28°C de temperatura e 75% de saturação de água. Esses achados corroboram com os de OUEDRAOGO *et al.* (1997), onde os isolados de *M. anisopliae* e *M. flavoviride* cresceram em temperatura entre 11 e 32°C, os de RIBEIRO *et al.* (1992) que observaram a viabilidade de conídios de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, em folhas de cana-de-açúcar por 14 dias a 28,3°C e 65% de umidade e os de ARTHURS & THOMAS (2001) quando mostraram que conídios de *M. anisopliae* apresentam esporulação ótima, à temperatura entre 20 e 30°C e alta umidade 96%.

O trabalho ora executado, mostra que *M. anisopliae* var. *anisopliae* quando inoculado no solo, em condições controladas pode ser recuperado. Esses resultados podem ser extrapolados para o campo, desde que antes da aplicação a linhagem já tenha sido caracterizada, a fim de que seja possível a comparação da mesma quando inoculada no solo (campo), com a recuperada após um certo período de tempo, para que seja observada a resposta ecológica, desse fungo ao ecossistema.

Em relação ao *M. anisopliae* var. *acridum* não houve recuperação do mesmo em nenhuma amostra, nas condições testadas, durante o período proposto.

*M. anisopliae* var. *acridum* se portou diferentemente de *M. anisopliae* var. *anisopliae* em função da sua recuperação no solo, conforme mostra a Tabela 2, ALVES (1998) relata que *M. flavoviride* é difícil de ser recuperado através de experimentos com solo em laboratório ou mesmo isolado de solo recentemente coletado no campo. Os resultados obtidos neste trabalho, no que se referem a recuperação deste fungo no solo, até 120 dias confirmaram os trabalhos de ALVES (1998).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA:

- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: S. B. Alves (ed). **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.11, p.289-371.
- ALVES, S.B. & MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: S. B. ALVES, (ed). **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.23, p.765-797.
- ARTHURS, S.; THOMAS M. B. Effect of dose, pre-mortem host incubation temperature and thermal behavior on host mortality, mycosis and sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in *Schistocerca gregaria*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, p. 411-420, 2001.
- DRIVER, F.; MILNER, R. F.; TRUEMAN, W. H. A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, v. 14, p. 134-150, 2000.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, Rio de Janeiro, R. J. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Rio de Janeiro. 52p., 1979.
- FARGUES, J.; ROBERTS, P. H. Persistence des conidiospores des hyphomycetes entomopathogenes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Nomuraea rileyi* (F.) Sanson et *Paecilomyces fumosoroseus*. Wige dans le sol, en conditions controlees. **Agronomie**, v.5, p. 73-80, 1985.
- FONTES, E. G. Fungo é o inimigo natural. In: O. M. Alvarenga(ed.) **Manual de Controle biológico**. Rio de Janeiro, Sociedade Nacional de Agricultura, 1992 p.27-28,
- INYANG, N.; McCARTNEY, A. H.; OYEJOLA, B.; IBRAHIM, L.; PYE, J. B. ; ARCHER, S. A.; BUTT, M. T. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological Research**, v.104, p. 653-661, 2000.
- LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. & ALVES, S. B. Produção de Fungos Entomopatogênicos, Ribeirão Preto: Alexandre de Sena Pinto, 2003, 92p.
- LINGG, A. J.; M. D. DONALDSON. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**., v.38, p.191-200, 1981.
- MAGALHÃES, B. P.; CAMARGOS, R. M. Controle de qualidade de micélio seco de *Metarhizium anisopliae*. XVI Congresso Brasileiro de Entomologia – **Resumos**. Piracicaba, 1993, p. 369.
- MAGALHÃES, B. P.; GOETTEL, M. S.; FRAZÃO, H. S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p. 162-164, 2000.

MARQUES, E. J.; ALVES, S.B.; MARQUES, I. M. R. Effects of the temperatures and storage on formulations with mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, p.153-160, 1999.

MENDONÇA, A.F. 2005. Cigarrinhas da cana-de-açúcar: controle biológico. Maceió, INSECTA, 317p.

OUEDRAOGO, A.; FARGUEST, J.; GOETTEL, M. S.; LOMER, C. J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride*. **Mycopathology**, v.137, p. 37-43, 1997.

QUINTELA, E. D. Estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) VUILLEMIN (Hyphomycetes) no solo e sua patogenicidade ao *Chalcodermus aeneus* BOHEMAN (Coleoptera: Curculionidae), praga do caupi. (Dissertação) Mestrado de Entomologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, ESALQ, 107p. 1986.

RIBEIRO, S. P. M. A.; LUNA ALVES-LIMA, E. A.; ASSUNÇÃO, W. T. G. Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Linhagem PL43) em folhas de cana-de-açúcar. *Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil*, N.21, p.59-67, 1992.

WALSTAD, J. D.; ANDERSON, R. F.; W. J. STAMBAUCH. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.16, p. 221-226, 1970.