

ANÁLISE DA CAPACIDADE INFECTIVA DE *Metarhizium anisopliae* (METCHNIKOFF) CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM PÓ CORPORAL LIOFILIZADO DE INSETOS ADULTOS DE *Diatraea saccharalis* (FABR., 1794) (CRAMBIDAE: LEPIDOPTERA)

João Gabriel Dumont Negrelli (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Victoria Batista Figueiredo da Silva (UEM), Ronaldo Roberto Tait Caleffe (PBA/UEM), Julio Cesar Polonio (UEM), Hélio Conte (DBC/PBA/UEM), João Alencar Pamphile (Orientador), e-mail: japamphile@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea: ciências biológicas, biologia geral.

Palavras-chave: Broca-da-cana, fungos entomopatogênicos, biocontrole.

Resumo:

A *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) causa severos danos à cultura de cana-de-açúcar, resultando em muitos prejuízos para produtores e problemas para o setor sucroalcooleiro. Uma das alternativas para o controle de *Diatraea saccharalis* foi o controle biológico utilizando o emprego de fungos entomopatogênicos como a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Para o bom crescimento desses micro-organismos, o meio de cultivo deve conter todos os elementos essenciais para o seu desenvolvimento. Tendo em vista que a composição e/ou suplementação do meio de cultura pode influenciar diretamente no crescimento e na sua capacidade de virulência, objetiva-se neste trabalho avaliar se a suplementação de meios de cultura com pó corporal liofilizado de *D. saccharalis* (PCDs) pode afetar a capacidade infectiva, ou seja, a virulência da linhagem fúngica *M. anisopliae* (MT), visando a utilização deste processo para o biocontrole de *D. saccharalis*. Para tal, foi realizado o cultivo do fungo em quatro meios, sendo eles, meio mínimo (MM), meio completo (MC), meio mínimo enriquecido com PCDs (MME) e meio completo enriquecido com PCDs (MCE). Foram utilizados 12 indivíduos para cada tratamento para a verificação da virulência dos fungos. A análise de mortalidade demonstrou que MME é estatisticamente semelhante ao MC com um tempo letal médio de 92,84 demonstrando assim que o PCDs pode ser utilizado para melhorar a virulência do *M. anisopliae*.

Introdução

O controle biológico tem se tornado uma importante estratégia de controle de pragas agrícolas (PINTO et al., 2006). Nesse contexto, vale ressaltar que um dos principais programas de controle biológico no Brasil visa a utilização de fungos entomopatogênicos, sendo os mais estudados *Metarhizium*

anisopliae e *Beauveria bassiana* (ALVES et al., 2008). A composição do meio de cultura influencia diretamente o crescimento, tendo em vista que *M. anisopliae* desenvolve-se nos mais diversos meios de cultura (HUBER, 1958). Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar se a suplementação de meios de cultura com pó corporal liofilizado de *D. saccharalis* poderia afetar a capacidade infectiva, ou seja, a virulência da linhagem fúngica *M. anisopliae* MT, visando a utilização deste processo para o biocontrole de *D. saccharalis*.

Materiais e métodos

Foi utilizada a linhagem *Metarhizium anisopliae* MT pertencente à Coleção de Micro-organismos Endofíticos e Ambientais do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (CMEA/LBIOMIC-UEM), originalmente isolada do inseto *Deois spp.* (Hemiptera: Cercopidae) e fornecida pelo Laboratório de Micro-organismos da ESALQ-USP. Os insetos em fase larval ou pré-pupa de *D. saccharalis* foram fornecidos pelo Laboratório de Morfologia e Citogenética de Insetos da Universidade Estadual de Maringá, com criação seguindo as recomendações de Parra (1999).

Foram utilizados insetos adultos congelados, os quais foram submetidos à liofilização no equipamento Christ Alpha 2-4 LDplus sob temperatura de -50°C (0,040 mbar), e sendo mantidos nestas condições por 4 dias. Após este período, os insetos foram macerados utilizando cadinho e pistilo, a fim de se obter o PCDs, sendo liofilizado novamente para retirar a umidade remanescente do pó (ANJOS et al. 2017). Para o crescimento da linhagem de *M. anisopliae* foi utilizado o Meio Completo (MC), Meio Completo Enriquecido com o PCDs (MC+E), Meio Mínimo (MM) e Meio Mínimo Enriquecido com o PCDs (MM+E). O PCDs foi utilizado para o enriquecimento dos meios MC+E e MM+E na concentração de 1g/L (PONTECORVO et al., 1953). Foram utilizados 12 indivíduos para cada tratamento (controle apenas com solução salina) em triplicata, totalizando 180 indivíduos por grupo os quais foram inoculados. Os indivíduos foram mantidos em recipientes de polietileno com algodão umedecido para manutenção da umidade. Os recipientes foram mantidos em incubadora biológica nas seguintes condições: 25°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas.

Os dados foram analisados pelo software R (R Core Team, 2020), com o editor RStudio (RStudio Team, 2020), utilizando o pacote “ecotoxicology” (GAMA, 2015). Para o cálculo da TL50 (tempo letal médio), foi utilizada a regressão de probit (unidade probabilística). O teste estatístico para verificar o ajuste dos dados ao modelo probit é o Qui-quadrado (X²), o qual verifica se as mortalidades esperadas e observadas são condizentes. Assim, a hipótese H₀ é esperada (p>0.05)

Resultados e Discussão

A avaliação da mortalidade de larvas de *D. saccharalis* com os meio mínimo suplementado com PCDs foi estatisticamente significativo. A análise foi

realizada durante 7 dias, com contagem diária do número de larvas vivas e mortas. Os resultados foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Percentual da Taxa Letal média (TL₅₀) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sobre pupas de *Diatraea saccharalis* em diferentes meios de cultura.

Tratamento	n	Inclinação (±EP)	TL ₅₀ (IC95) ^(*)	X ²	p-valor
MM	30	7,59±15,98	81,75±(72,20; 90,76) ^{a,b}	124,9,34	1
MC	30	17,15±2,53	92,77±(85,73; 99,27) ^a	3,87	0,432
MME	30	19,69±2,12	92,84±(85,74; 98,96) ^a	1,62	0,102
MCE	30	7,55±8,55	74,67±(65,75; 83,49) ^b	362,79	1

n: Número de insetos utilizados; EP=erro-padrão; IC: Intervalo de confiança; X²: Qui-quadrado; (*): Diferença significativa com base nos intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

Aplicando os testes estatísticos para o cálculo do tempo letal médio, constata-se que MME é estatisticamente semelhante ao MC. Dos Anjos (2017) apresentou resultados significativos para MME, sendo ele de maior destaque quanto ao crescimento, viabilidade e velocidade de germinação dos conídios. De acordo com Leão et al. (2011), o fungo *M. anisopliae* pode reagir de diferentes maneiras de acordo com as condições de cultivos, podendo desencadear expressões variadas em seus genes. Para romper a cutícula dos insetos alvos os fungos entomopatogênicos produzem peptidases, sendo a Pr1 uma das mais estudadas em *M. anisopliae*, a qual é retraída na presença de excesso de nutrientes e induzida em condições menos favoráveis, como em meios pobres nutricionalmente (REZENDE et al., 2009). Então pode-se supor que por conta de uma interação entre o meio completo, PCDs e fungo, a virulência do fungo foi comprometida, diferente do observado em meio mínimo com adição de PCDs.

Conclusões

Foram observados resultados de aumento de virulência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, meio de cultura completo e meio de cultura mínimo suplementado com pó corporal liofilizado de *Diatraea saccharalis*, apresentando um bom potencial biotecnológico quanto ao controle do inseto praga *D. saccharalis*, popularmente conhecido como broca-da-cana.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica. CAPES e Fundação Araucária pelo financiamento e apoio financeiro.

Referências

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.69-110..

ANJOS, D. L. Desenvolvimento de meio alternativo para *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) sorokin enriquecido com extrato liofilizado de insetos adultos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Crambidae:Lepidoptera). 2017. 29 f. **Trabalho de conclusão de curso** (graduação em Tecnologia em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

HUBER, Johann. Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. **Archives of Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 257-276, 1958.

GAMA, J. (2015). ecotoxicology: Methods for Ecotoxicology. R package version 1.0.1. <https://CRAN.R-project.org/package=ecotoxicology>

LEÃO, P. C. M.; OLIVEIRA, T. N.; Expressão diferencial de genes envolvidos na virulência durante a germinação, conidiogênese e patogênese em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. 2011. Tese (Doutorado). **Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137p

PINTO, A. de S. Controle de pragas da cana-de-açúcar. **Sertãozinho: Biocontrol**, 2006, 64p.(Boletim Técnico Biocontrol, n.1).

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidullans*. **Advances in Genetics**. v. 5 p.141-238, 1953.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

REZENDE, J. M. Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteinases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). 2009. **Dissertação (Mestrado em Entomologia)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. doi:10.11606/D.11.2010.tde-24022010-095604. Acesso em: 2020-08-12.