

Atividade antifúngica e estudo fitoquímico do fungo entomopatogênico *Metarhizium* sp.

Antifungal activity and phytochemical study of entomopathogenic fungus *Metarhizium* sp.

RESUMO

Antonio Aparecido Vital Junior
antonio.2015@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Juliana Feijó de Souza Daniel
julianafeisouza@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Karoline Oliveira Morais
moraiskarolineoliveira@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Humberto Godoy Androcioli
humbertoandrocioli@gmail.com
Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Objetivo: Os fungos entomopatogênicos são fungos que parasitam insetos e são potenciais alvos para estudos de biocontrole. O objetivo deste trabalho foi a realização de atividade inseticida frente ao percevejo *Dichelops melacanthus* usando extratos orgânicos e esporos de seis isolados fúngicos entomopatogênicos. **Metodologia:** Para o teste inseticida, foi aplicada nos insetos por meio de borrifador spray, soluções esporicas de diferentes concentrações e dos extratos com concentrações de 5mg/ml. Após a aplicação a mortalidade foi monitorada diariamente durante 10 dias. **Resultados:** Ao fim dos 10 dias foi constatada uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40%, porém os controles apresentaram números equivalentes. Os insetos que apresentaram mortalidade foram recolhidos individualmente em câmaras úmidas para nova esporulação e re-isolamento dos fungos e/ou novas cepas a partir dos insetos testados. **Conclusão:** A metodologia do teste de controle biológico dos isolados contra o percevejo *Dichelops melacanthus* foi bem estabelecida, porém devido aos resultados estes ensaios serão repetidos. Foram isoladas 12 novas cepas fúngicas a partir dos percevejos.

PALAVRAS-CHAVE: Biocontrole. *Metarhizium*. *Melacanthus*. Fungos.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Objective: Entomopathogenic fungi are fungi that parasitize insects and potential targets for biocontrol studies. This work was a performance of insecticidal activity against the bug *Dichelops melacanthus* using extracts and organic spores of six entomopathogenic isolates. **Methodology:** For the insecticide test, it was applied to the insects by spray, sporical solutions of different concentrations and extracts with concentrations of 5mg / ml. After application mortality was monitored daily for 10 days. **Results:** At the end of 10 days, a mortality rate of approximately 40% was found, but the controls showed equivalent numbers. Insects with mortality were collected individually in humid chambers for new sporulation and re-isolation of fungi and/or new strains from the insects tested. **Conclusion:** The methodology of the biological control test of isolates against the bug *Dichelops melacanthus* was well established, but due to the results these assays will be repeated. Twelve new fungal strains were isolated from bedbugs.

KEYWORDS: Biocontrol. *Metarhizium*. *Melacanthus*. Fungi.

INTRODUÇÃO

Página | 2

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo devido a abundância de terras cultiváveis em nosso território. Com a crescente expansão de terras destinadas ao cultivo, cresce também o número de defensivos agrícolas necessários para a manutenção da produção das plantas e o controle das pragas.

Atualmente há no Brasil mais de 500 tipos de agrotóxicos liberados pela Anvisa. O uso incorreto e indiscriminado desses defensivos o tornam o segundo maior responsável pela contaminação de rios no país, sendo que mais de 90% dos produtos não atingem a praga alvo e conseqüentemente vão parar no solo, ar e água subterrânea.

Além da poluição ambiental, os químicos sintéticos também são altamente tóxicos para a saúde humana quando ministrados incorretamente. Estudos recentes apontam que o uso descomedido desses químicos pode ter ligação direta com o aumento de doenças cardiovasculares, câncer, Alzheimer e até mesmo o autismo.

Dessa forma, é necessário e em caráter de urgência, que a comunidade científica volte seus esforços para o estudo de meios alternativos para o controle de pragas, usando o controle biológico com microrganismos, afim de diminuir o uso dos sintéticos, visto que é um grande problema não só ambiental, mas também de saúde pública.

Os fungos entomopatogênicos são fungos que parasitam insetos, geralmente esporulam externamente no corpo do inseto hospedeiro sob condições de alta umidade, e em alguns casos esporulam no interior do organismo hospedeiro (abdômen) (ALVES; FARIA, 2010)

Para o viés econômico, culturas que implementam o controle biológico podem ter maior aceitação da sociedade, da indústria e do comércio de exportação, tendo a garantia de um produto mais saudável e sustentável. Com isso, o objetivo deste trabalho foi a realização de atividade inseticida frente ao percevejo *Dichelops melacanthus* usando extratos orgânicos e esporos de seis isolados fúngicos entomopatogênicos.

METODOLOGIA

MACROCULTIVO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As seis cepas isoladas de insetos foram cultivadas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar) à 25° C. Após o cultivo as placas serão préinoculadas em 100 ml de meio líquido suplementado, dividido em dois frascos Erlenmeyer (250ml), contendo: 3,0 g de glicose; 0,2 g de bactopectona; 0,1 g de extrato de levedura; 0,05 g de *MgSO₄. 7H₂O*; 0,05 g de *KH₂PO₄*. Os frascos foram incubados em agitador rotativo (200 rpm), durante sete dias. Essas culturas inoculadas em 2 litros de meio para cada isolado fúngico (DANIEL et al., 2016). Os cultivos foram filtrados e a parte líquida extraída com acetato de etila e o micélio com metanol.

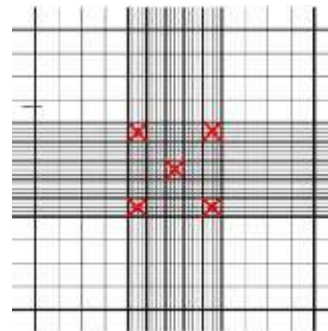
TESTE INSETICIDA

Página | 3

Para a contagem dos esporos dos seis fungos entomopatogênicos, sendo eles, JUVES004, JUABE001, JUABE007, JUFOR006, JUABE002 e JUBES001 foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados por sete dias a 25 °C em estufa (Figura 1). Foram adicionadas 10 ml de água destilada em cada placa, e com auxílio de uma alça de platina, foi realizada a leve raspagem do micélio, para remoção dos esporos. O conteúdo das placas foi transferido para beckers estéreis, e completado com água destilada até um volume de 30 ml, para o fungo JUABE 002, e volume de 50 ml para as demais culturas fúngicas. A partir dessa suspensão fúngica, 1 µL de cada amostra foram adicionados à câmara para contagem diferencial em microscópio luminoso segundo a fórmula:

Contagem de esporos = média do nº total de esporos nos cinco pontos selecionados * $(2,5 * 10^5)$ [esporos/ml].

Figura 1 – Contagem de esporos na câmara de Neubauer



Fonte: autoria própria

Foram realizados dois testes inseticida, que estão divididos em 1 e 2 (figura 2). A tabela 1 mostra os tratamentos realizados no primeiro teste inseticida.

Para o teste inseticida 1 a suspensão de esporos dos seis isolados fúngicos entomopatogênicos foram testados contra o inseto *D. melacanthus*. O delineamento utilizado foi de blocos inteiramente casualizados, com 9 tratamentos e 5 repetições

Tabela 1 – Tratamentos do teste inseticida 1

Tratamento	Tipo do tratamento
1	Água destilada
2	JUVES 004
3	JUABE 001
4	JUABE 007
5	JUFOR 006
6	JUABE 002
7	JUBES 001
8	Engeo Pleno - inseticida
9	Testemunhas (sem nenhum tipo de tratamento)

Fonte: autoria própria.

As suspensões de esporos foram aplicadas utilizando borrifador spray, sendo realizadas 3 aplicações sobre cada caixa de acordo com cada um dos tratamentos, propiciando gotas finas sobre a superfície das ninfas de *D. melacanthus*. O ensaio foi mantido em sala climatizada com 28º C de temperatura. O inseticida Engeo Pleno S TM (Lambda Cialotrina 106 g/L + Tiametoxam 141 g/L) será utilizado como controle (0,125%). Os insetos foram monitorados diariamente, durante dez dias para verificar a mortalidade. Durante esse período foi verificada, a dieta que continha vagem de feijão, soja e amendoim e a umidade de cada caixa controlada por um algodão embebido de água.

Figura 2 – Teste inseticida



Fonte: autoria própria

Os insetos que apresentaram mortalidade durante o experimento foram transferidos para câmara úmida individual, contendo algodão umidificado com água destilada, afim de verificar-se a esporulação de fungos sobre cada inseto morto, conforme a imagem abaixo.

Figura 3 – Câmara úmida



Fonte: autoria própria

Para o teste inseticida 2 foi utilizado a mesma metodologia do teste 1, porém com novos tratamentos. Para os extratos obtidos (JUVES 004, JUABE 007, JUFOR 006 E JUABE 001) foram preparados para aplicação em concentração de 5mg/ml de extratos para 10 ml de amostra dissolvidos em 1 ml de DMSO (Dimetil sulfóxido) e Tween.

Página | 5 Tabela 2 – Tratamentos teste inseticida 2

tratamentos	Tipos de tratamentos
1	Água destilada
2	Dmso/Tween
3	Esporos 28- T4
4	Esporos 24- T3
5	Extrato JUVES 004
6	Extrato JUABE 007
7	Extrato JUFOR 006
8	Extrato JUABE 001

Fonte: autoria própria.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparação de médias de Scott-Knott a 5% de significância. Para o cálculo das porcentagens de eficiência de controle das ninfas de *D. melacanthus* será utilizada a fórmula de Schneider-Orelli's (PUNTENER, 1981).

O isolamento de novas cepas foi realizado em meio BDA, por meio dos insetos que foram recolhidos em câmara úmida.

O teste antifúngico dos extratos orgânicos frente ao fungo *Fusarium oxysporum* não apresentou resultados satisfatórios e/ou contaminou as placas (dados não apresentados).

RESULTADOS

Ao final dos 10 dias os dados foram aplicados no teste de Scott-Knott que não conclui resultados significativos a 5% de significância como mostram as tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Análise de variância para o experimento 1

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)
Blocos	4	2524,444	631,1111	1,383678	2,668421
Tratamentos	8	16160	2020	4,428745	2,244396
Resíduo	32	14595,56	456,1111		
Total	44	33280			
C.V.	42,15%				

Fonte: autoria própria

Tabela 4 – Análise de variância para o experimento 2

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)
Blocos	4	2560	640	1,317647	2,714059
Tratamentos	7	3200	457,1429	0,941176	2,35926
Resíduo	28	13600	485,7143		
Total	39	19360			
C.V.	64,82%				

Fonte: autoria própria

Pode-se verificar o alto índice percentual do coeficiente variância, também uma diferença significativa entre os resultados de F calculado e F tabelado a 5%, demonstrando que há tratamentos diferentes dos demais, o que indica que não há uma progressão linearmente regular na curva de variação de mortalidade. Porém analisando apenas os tratamentos contendo fungo ou extrato pode-se verificar uma taxa de mortalidade total de aproximadamente 42% no teste 1 e 36% no teste 2, sendo que os fungos JUABE001 e JUABE007 atingiram 52% de mortalidade no primeiro teste e o extrato JUABE007 atingiu 48% no segundo teste. O extrato JUFOR006 apresentou 44% de mortalidade também no segundo teste. Todos os tratamentos citados acima indicam grande potencial inseticida.

Foram isoladas 12 novas cepas fúngicas após os testes, estas darão origem a futuros testes.

CONCLUSÕES

Considerando a alta mortalidade dos controles e as taxas de variância do experimento como um todo, não é possível afirmar o potencial bioinseticida para os fungos testados, logo é necessário a repetição dos ensaios para uma nova análise e seleção dos fungos com maior potencial inseticida.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Juliana Feijó, pelo empenho, dedicação e elaboração do projeto. Ao Dr^o Humberto Androcioni do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pela infraestrutura nos testes. A DIRPPG e PROPPG pelos recursos financeiros através de editais internos.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno Manual sobre fungos entomopatogênicos**, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. **SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan**. Revista Brasileira de Agrocomputação, V.1, N.2, p.18-24. 2001.

ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. **Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas**, SaBios: Rev, Saúde e Biol, v.6, n.2, p.79-82, mai/ago, 2011

PUNTENER, W, **Manual for field trials in plant protection**, Second edition, Agricultural Division Ciba-Geigy Limited, 1981