

ENSAIOS COM O FUNGO METARHIZIUM ANISOPLIAE EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO OBJETIVANDO O CONTROLE DE PRAGAS DAS PASTAGENS NO PONTAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Tests with *Metarhizium Anisopliae* under Laboratory Conditions Objectifying
Pest Control of Pasture in the Pontal do Triângulo Mineiro

Adrielle Gonçalves de Oliveira, José Maria Franco de Assis

RESUMO

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Fundação Educacional de Ituiutaba, unidade associada à Universidade do Estado de Minas Gerais – FEIT/UEMG. O objetivo do trabalho foi avaliar em laboratório a reprodução do fungo *Metarhizium anisopliae* através do produto industrial Metarril® diluído (2g em 20 ml de água) e em pó, em dois meios de cultura (BDA e BDA acrescido de sacarose) em placas de Petri e tubos de ensaio. Posteriormente, verificar a sua eficiência no controle de *Cornitermes cumulans*, comparando-a a ação do Fipronil (formulação Regent® 800 WG) e finalmente, observar a interação entre o Metarril (*M. anisopliae*+inerte) e Fipronil. O primeiro ensaio avaliou a reprodução do fungo nos tratamentos constituídos por Metarril diluído e em pó, em BDA com e sem sacarose, utilizando como recipientes tubos de ensaios e placas de Petri. O segundo ensaio, objetivando o controle de cupins, foi constituído por água pura, Regent 800 WG (4g/100 ml), Metarril (16g/100 ml) e Regent 800 WG+Metarril (8g+2g/100 ml), em placas de Petri. No primeiro ensaio o melhor resultado foi obtido na placa de Petri com BDA acrescido de sacarose; o fungo desenvolveu-se, porém houve contaminação com outros microorganismos. No segundo ensaio, não houve uma interação esperada dos produtos integrados no controle de cupins. O tratamento mais eficiente foi com o Metarril isolado, conforme Teste do Qui-Quadrado ($P < 0,05$).

Palavras-chave: Fungos Entomopatogênicos. *Cornitermes Cumulans*. Pecuária.

ABSTRACT

The study was conducted at the Laboratory of Microbiology of the Educational Foundation of Ituiutaba, unit associated with the University of Minas Gerais - FEIT / UEMG. The objective of this study was to evaluate in the laboratory reproduction of the fungus through the *Metarhizium anisopliae* Metarril ® industrial product diluted (2 g in

20 ml of water) and powder in two culture media (BDA and BDA plus sucrose) in petri dishes and test tubes. Later, check its efficiency in controlling *Cornitermes cumulans*, comparing it to the action of Fipronil (Regent® 800 WG formulation) and finally, observe the interaction between the Metarril (*M. anisopliae* + inert) and Fipronil. The first trial evaluated the reproduction of the fungus in treatments consisting of Metarril diluted powder, BDA with and without sucrose, using containers as test tubes and petri dishes. The second trial, aiming to control termites, consisted of pure water, Regent 800 WG (4g/100 ml) Metarril (16g/100 ml) and Regent 800 WG + Metarril (8g + 2 g/100 ml) on plates Petri. In the first experiment the best result was obtained in the petri dish with PDA plus sucrose, the fungus developed, but there was contamination with other microorganisms. In the second trial, there was an expected interaction of the products included in termite control. The most effective treatment was with Metarril isolated as Qui-Quadrado ($P < 0.05$).

Keywords: Entomopathogenic Fungi. *Cornitermes Cumulans*. Livestock.

1. INTRODUÇÃO

Conforme relata a História do Brasil, quando os portugueses aqui chegaram, não encontraram rebanho bovino. As primeiras introduções foram feitas por Tomé de Sousa e Martim Afonso de Souza, na Bahia e Capitania de São Vicente, respectivamente. Ao longo do tempo e com as missões de desbravamento comandadas pelos bandeirantes, a área ocupada para criação de gado estendeu-se às regiões do interior do país, entre elas inclui-se o estado de Minas Gerais. Atualmente, 65% da área agropastoril do país é destinada à criação de gado, sendo o clima um fator decisivo, uma vez que é possível obter pastagens de boa qualidade durante todo o ano devido a distribuição pluviométrica e às temperaturas favoráveis ao desenvolvimento de gramíneas.

Entretanto, este é um setor que ainda apresenta baixo nível de produtividade, uma vez que os produtores enfrentam dificuldades em manejar as pastagens de forma correta, deixando de obter maior produção de carne e leite. Grande parte dos pecuaristas recorre aos produtos químicos para controlar pragas como cigarrinhas, formigas, cupins, entre outras. Todavia, a utilização incorreta de tais produtos pode ocasionar toxicidade ao próprio

rebanho, além de não apresentar o efeito esperado.

Nos últimos anos as pesquisas têm-se voltado para formas alternativas de controle de pragas e doenças de menor impacto ao ambiente, e que tenham efeito em longo prazo. As pragas de pastagens como a cigarrinha e o cupim de montículo podem ser controladas por espécies de fungos entomopatogênicos, por exemplo, *Metarhizium anisopliae*. Entretanto, muitos pequenos e médios produtores não têm condições de adquirir o fungo industrializado, desconhecem a ação do controle biológico ou estão totalmente alheios ao manuseio e técnicas desse tipo de manejo.

O que se propôs neste trabalho foi acompanhar o melhor desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios a fim de obter um produto de qualidade e eficiência semelhante aos produtos encontrados no mercado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar em nível de laboratório, propágulos de reprodução do fungo da espécie *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura e comparar sua eficiência no controle de *Cornitermes cumulans* em relação a produtos existentes no mercado, sendo desenvolvido no laboratório de microbiologia da FEIT-UEMG.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a eficácia do controle biológico em relação ao controle químico;
- Avaliar a interação dos produtos Metarril e Regent 800 WG® no controle da praga;
- Analisar a eficiência do fungo *Metarhizium anisopliae* obtido no laboratório de microbiologia da FEIT-UEMG.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pecuária e Cornitermes cumulans

Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil a atividade pecuária ocupa um lugar de destaque, pois grandes extensões dessas áreas são utilizadas para criação de gado, tanto de corte quanto de leite. As áreas utilizadas para pastagem, comumente, apresentam um nível de mecanização muito baixo, propiciando assim, a infestação de algumas espécies de insetos, entre eles o *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) conhecidos também como cupins de montículos. Esses insetos são assim identificados por construírem, com solo e sua própria “saliva”, montes pequenos (cupinzeiros) onde podem se abrigar e realizar seu desenvolvimento (GALLO et al., 2002).

Os prejuízos causados por esses insetos vão desde a diminuição da área útil da pastagem até o aumento na dificuldade de movimentação dos animais manejados, além do que muitas vezes esses montes servem como abrigo para animais peçonhentos como cobras, aranhas, escorpiões. Os métodos mais utilizados no controle do *C. cumulans* foram, durante várias décadas, o controle químico a base de inseticidas, em sua maioria clorados, e o controle cultural que consiste na destruição dos cupinzeiros com máquinas ou até mesmo de forma manual. Este último método mostrava-se ineficiente, pois os montículos eram reconstruídos ou os cupins se instalavam em outro local da área reiniciando o processo de construção do cupinzeiro. O primeiro método apresentava-se eficiente quanto à eliminação da praga, porém o produto utilizado na aplicação (inseticida) tem um custo muito elevado e efeito residual relativamente alto, podendo causar danos irreparáveis a flora e fauna nativas, lençóis freáticos e rios. Além disso, a aplicação incorreta desses produtos pode ocasionar a contaminação das pessoas responsáveis pela aplicação ou não surtir os efeitos esperados sobre a espécie a ser controlada (FERNANDES et al., 1998).

3.2 Controle biológico

Um método de controle que tem se mostrado pouco ofensivo ao ambiente e demonstrado bons resultados é o controle biológico. Entende-se por controle biológico o uso de insetos, nematóides, viroses, bactérias e fungos que causam algum tipo de endemia na população de insetos que se deseja controlar (NETO, 1988). Para Bento et al. (2002), controle biológico é um fenômeno natural para que se regule o número de pragas por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica, que toda espécie possui durante seu ciclo de vida.

No século III a.C. os chineses foram os primeiros a usar predadores para controlar lepidópteros desfolhadores e coleobrocas de citrus, caracterizando os primórdios do controle biológico. Porém, com relação à parasitóides, foi U. Aldrovande em 1602, o primeiro estudioso a relatar o controle da lagarta das crucíferas por *Apanteles glomeratus* (CLAUSEN, 1956).

De acordo com Greathead e Greathead (1992), aproximadamente 550 espécies foram alvo de 1200 introduções em pesquisas, estudos e programas de controle biológico e muitas outras passaram pela tentativa de controle por meio de programas de conservação e/ou multiplicação. Atualmente, o controle biológico é um dos pilares de sustentação de programas de manejo integrado de pragas (MIP), isto porque neste momento se discute muito a produção integrada rumo a uma agricultura sustentável (BENTO et al., 2002).

3.3 *Metarhizium anisopliae*

Segundo Fernandes (1993), uma das formas de controle biológico do *C. cumulans* é a utilização do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomicetes). O *Metarhizium* foi identificado pela primeira vez por Metschnikov, em 1879, em um coleóptero (*Anisoplia austríaca*) como *Entomophthora anisopliae*, que se caracterizava por atacar uma grande variedade de insetos. Em 1883, Sorokin o classificou como é conhecido atualmente (*M. anisopliae*). Posteriormente, Tulloch (1976) revisou tal classificação baseada em características morfológicas e aceitou somente

duas espécies como sendo pertencentes ao gênero *Metarhizium*: *M. flavoviridae* e *M. anisopliae*. Esses fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80% das doenças capazes de provocar epizootias em populações de insetos. Chama-se epizootia uma doença que existe constantemente em determinada lugar e ataca animais específicos. Isto se dá principalmente pelo fato de que esses fungos agem por contato ao invés de ingestão, são de fácil disseminação e sua produção em larga escala em meios artificiais é relativamente simples (ALVES; PEREIRA, 1989; ZIMMERMAN, 1993; COUTINHO, 1996; DRIVER et al., 2000; MELO; AZEVEDO, 2000; MOINO JUNIOR, 2000).

Alguns trabalhos já realizados com *M. anisopliae* comprovaram sua eficácia no controle de diversas pragas. Segundo Alves (1998), o patologista e zoologista Ilya Metchnikov, realizou o primeiro trabalho de controle microbiano usando um fungo entomopatogênico, em 1879, quando aplicou *M. anisopliae* em larvas de um curculionídeo, importante praga da beterraba, e obteve um controle máximo de 80% dos insetos após 15 dias de aplicação. A partir desse estudo pioneiro, as variedades e raças diversas de *M. anisopliae* têm sido aplicadas e observadas sobre múltiplas espécies de pragas e culturas.

No interior dos insetos o *M. anisopliae* libera substâncias tóxicas conhecidas como dextrinas e coloniza mais facilmente o hospedeiro. O inseto é morto e os conídios ou esporos são exteriorizados podendo ser disseminados pelo vento, água ou quando há contato com outros insetos. De acordo com Azevedo (1998), mais de 300 espécies de insetos são colonizadas por *Metarhizium anisopliae*.

Segundo Van Den Bosch et al., (1982), os entomologistas utilizam o termo parasito para designar insetos que parasitam insetos, o que não inclui o controle biológico através de fungos ou outros microorganismos. Ainda de acordo com tal autor, o termo correto para esta categoria seria patógeno, isto é, organismos que causam doenças em insetos a ponto de paralisar seu desenvolvimento ou levá-los a morte. Os insetos colonizados por *M. anisopliae* apresentam uma cobertura pulverulenta de conídios e tornam-se rígidos. Tal

doença deixa o inseto com um aspecto esverdeado ao final da conidiogênese, por isso é conhecida como muscardine verde (MACEDO, 2005).

3.4 Produção de patógenos

De acordo com Leite et al. (2003), para produção do patógeno deve-se considerar as técnicas de menor custo e que permitam a obtenção de alta concentração de formas viáveis e virulentas, que possam ser formuladas e utilizadas para o controle de pragas. Ainda sobre os mesmos autores, existem quatro estruturas fúngicas diferentes que podem ser reproduzidas e utilizadas no controle do ciclo natural do patógeno: os conídios, que exercem a função de reprodução e disseminação; blastósporos, com função de disseminação na hemolinfa do hospedeiro; micélio, com função de migrar para fora do hospedeiro e permitir a conidiogênese do fungo e esporos que permitem a sobrevivência do fungo no solo. No caso do *M. anisopliae* que é um fungo pertencente à classe dos hifomicetos, as estruturas mais utilizadas são os conídios e blastósporos por serem altamente infectivas ao hospedeiro. A escolha da forma do fungo que se utilizará vai depender da espécie e isolado do patógeno, da dificuldade na sua produção, do ambiente onde será aplicado e do método de aplicação (BOUCIAS et al., 1998).

Basicamente, um meio de cultura para produção *in vitro* de patógenos, deve conter fonte de carbono e de nitrogênio, sais minerais e alguns fatores de crescimento (SOPER; WARD, 1981). Assim, dependendo do tipo do propágulo e da espécie desejados na reprodução, os fungos podem ser multiplicados sobre meios artificiais utilizando-se três processos ou métodos: meios líquidos ou fermentação submersa; meios sólidos ou semi-sólidos e fermentação bifásica, na qual são utilizados os meios líquidos ou semilíquidos para crescimento vegetativo e posteriormente, substratos sólidos para esporulação (ALVES, 1998).

De acordo com Madigan (2003), o crescimento de fungos pode ser representado por uma curva de crescimento com quatro fases distintas: lag, log, estacionária e de declínio (Figura 1). A fase “lag” é considerada como fase

de adaptação em que não há um aumento significativo da população; a fase “log” ou exponencial é aquela em que o microorganismo, já adaptado, começa a absorver nutrientes do meio-de-cultura e sintetizar os mesmos. Quando os nutrientes começam a ficar escassos e os produtos tóxicos tornam-se mais abundantes, o microorganismo encontra-se na fase estacionária. Na próxima fase há uma redução gradativa do número de células viáveis; esta é a fase de declínio.

Na produção em meios líquidos ou semisólidos, há formação de uma massa micelial compacta e, em algumas condições formação de blastósporos. O material originado ainda precisa formar o estágio infectivo, o que pode ocorrer no meio líquido ou sobre o material formulado e aplicado no campo (MOINO JUNIOR, 2000).

A utilização de meios sólidos, entretanto, é a prática mais comum na produção de fungos entomopatogênicos por não necessitar de tecnologias mais sofisticadas. Essa metodologia vem sendo usada há alguns anos na produção de *M. anisopliae*, porém, para controlar cigarrinhas da cana-de-açúcar no Nordeste, em laboratórios de usinas de açúcar (MARQUES et al., 1981).

Para os fungos serem utilizados no controle microbiano de pragas numa estratégia chamada introdução inundativa, onde os organismos são criados massalmente em laboratório e liberados periodicamente na região infestada pela praga, precisam estar disponíveis em grandes quantidades. Isso se deve ao fato de que, geralmente, insetos precisam de um alto teor de inóculo para serem colonizados por esses patógenos. Todavia, alguns fungos têm condições de se estabelecerem em determinada região após introdução inoculativa, ou seja, organismos coletados em uma área de exploração são introduzidos na área onde se pretende controlar a praga. Sendo assim, as dosagens podem ser mais baixas, porém suficientes para formação do foco inicial ou primário, para a ocorrência da doença (ALVES, 1998).

Segundo Batista Filho et al. (1998), formular um microorganismo entomopatogênico é acrescentar às suas características compostos que

tenham por objetivo melhorar seu desempenho no campo, facilitar o manuseio e aplicação e, sobretudo, permitir o armazenamento sob condições nas quais se minimize os custos, com perda mínima das qualidades do produto. Sendo os fungos organismos vivos, eles necessitam de cuidados especiais, pois possuem estruturas que devem ser mantidas durante o processo de produção, formulação, nas condições de armazenagem e ambiente propício após sua aplicação no campo (MOINO JUNIOR, 2000).

3.5 Fipronil

Fipronil é um inseticida do grupo fenil-pirazol, que atua sobre o sistema nervoso central (SNC), interferindo na passagem de íons de cloreto através do GABA (ácido gama-aminobutírico). Esse ácido é importante transmissor de impulsos nervosos em animais vertebrados e invertebrados, causando nestes últimos o descontrole do SNC, superexcitação e subsequente, morte (ANDREI, 1996).

Em relação à toxicidade do fipronil em inimigos naturais e microorganismos existem vários estudos contraditórios em seus resultados. Uma pesquisa denominada Locustox, realizada em países africanos, concluiu que o fipronil é relativamente tóxico aos invertebrados benéficos testados, devendo-se realizar pesquisas mais profundas para verificação do seu potencial para o Manejo Integrado de Pragas em agrossistemas. Outros trabalhos revelam que a toxicidade de fipronil para organismos não alvos é baixa (TILLMAN; SCOTT, 1997; ELZEN et al., 1998; SOARES; BUSOLI, 2000).

O fipronil é muito utilizado na cultura da cana-de-açúcar para controle não só do *Cornitermes cumulans* como também para outras espécies como o *Heterotermes tenuis*, que são consideradas as mais frequentes e de maior distribuição nessa cultura. O fipronil, além da cana-de-açúcar, também é utilizado em pastagens e culturas como batata, milho e algodão, em aplicações foliares ou no solo. Macedo et al. (1997), ainda estudou a eficácia de controle de vários inseticidas para *H. tenuis* durante dois anos, obtendo o melhor

resultado com o fipronil na formulação Regent 800 WG® (ARRIGONI et al., 1989; MACEDO, 1995).

A utilização de produtos fitossanitários seletivos juntamente com a aplicação de entomopatógenos pode contribuir favoravelmente para o manejo de determinada praga. A ação de produtos fitossanitários sobre entomopatógenos pode variar desde a inibição do crescimento vegetativo e da conidiogênese, até a ocorrência de mutações genéticas, alterando sua virulência. Portanto, para realização desse tipo integrado de controle devem-se considerar os possíveis efeitos fungitóxicos dos produtos a serem utilizados. Segundo Alves e Moino Junior (1998), alguns produtos fitossanitários possuem uma capacidade estressora que favorece o controle associado, atuando em mecanismos comportamentais, como acontece com os cupins. Como esses insetos possuem uma capacidade de limpeza que mantêm as colônias livres de patógenos e dificulta o controle microbiano, a utilização de inseticidas em concentrações extremamente baixas (subletais) pode alterar esse comportamento, agindo de forma sinérgica (ZECK, 1992; BOUCIAS et al., 1996; ALVES et al., 1998).

Trabalhos realizados em laboratório mostraram que a molécula fipronil não afeta o aparecimento e desenvolvimento do *M. anisopliae*, porém a eficácia da combinação não foi satisfatória como ocorre com *Beauveria bassiana* associado à imidacloprid (ALMEIDA; ALVES, 1998). Batista Filho et al. (1996), avaliaram a compatibilidade do produto fipronil com *B. bassiana*, visando sua utilização conjunta para o controle de *Cosmopolites sordidus* Germar. Os resultados mostraram que o fipronil não provocou redução significativa na produção de conídios, mesmo tendo afetado ligeiramente o diâmetro médio da colônia quando comparado à testemunha, além de não ter havido alterações na viabilidade dos conídios produzidos.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Localização

O projeto foi realizado no período de 1º de abril de 2008 a 30 de outubro de 2009, no Laboratório de Microbiologia da Fundação Educacional de Ituiutaba, unidade agregada à Universidade do Estado de Minas Gerais, campus de Ituiutaba, Minas Gerais.

4.2 Obtenção de amostra inicial do fungo e do fipronil

A amostra inicial para consequente reprodução do fungo foi adquirida via concessão da empresa Itaforte Ltda., que forneceu o produto industrializado Metarril®, mediante solicitação efetuada às unidades responsáveis por estudos entomopatogênicos, entre eles o da espécie *Metarhizium anisopliae*. O fipronil sob a forma comercial Regent® 800 WG foi obtido através da empresa Basf.

4.3 Preparo dos meios de cultura

Foram preparados dois meios de cultura: BDA (batata, dextrose e ágar) e BDA acrescido de sacarose, conforme mostram os Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Composição do BDA.

BDA (batata, dextrose e ágar)	
Batata para extração de amido	200 g
Dextrose	15 g
Agar	20 g
Água destilada	1000 ml

Cortou-se a batata em rodela e colocou-a para cozinhar por aproximadamente 15 minutos. Filtrou-se o caldo obtido e fez-se a mistura com a dextrose e o ágar, sendo que a mistura deste último ao caldo foi realizada com aquecimento. O recipiente em que se encontrava a mistura foi vedado com papel alumínio e levado à autoclave por, aproximadamente, 20 minutos. Após o processo de esterilização e resfriamento, o material foi colocado em placas de Petri ou tubos de ensaio e mantido em local estéril.

Quadro 2. Composição do BDA + Sacarose.

BDA acrescido de sacarose	
Batata para extração de amido	200 g
Dextrose	15 g
Agar	20 g
Sacarose	25 g
Água destilada	1000 ml

A metodologia utilizada no segundo meio de cultura foi a mesma

empregada no quadro 1, acrescida de sacarose. O recipiente em que se encontrava a mistura foi vedado com papel alumínio e levado à autoclave por, aproximadamente, 20 minutos. Após o processo de esterilização e resfriamento, o material foi colocado em placas de Petri ou tubos de ensaio e mantido em local estéril.

4.4 Inoculação do Metarril nas placas de Petri e tubos de ensaio

O fungo obtido industrialmente foi inoculado nas placas utilizando-se duas variações: o produto em pó sem diluição e dissolvido em água destilada. Neste último foram utilizadas 2g de Metarril para 20 ml de água.

Com o auxílio de uma alça de platina o material foi espalhado de forma regular (estriado) sobre as placas de Petri e também nos tubos de ensaio. O procedimento foi realizado em câmara previamente esterilizada e, posteriormente, o material foi levado à estufa com temperatura ideal para o desenvolvimento do *Metharizium anisopliae* ($26 \pm 0,5$ °C).

4.5 Coleta de *Cornitermes cumulans*

Foram coletados em campo indivíduos da espécie *Cornitermes cumulans* e levados a laboratório. Em cada placa foram colocados 10 cupins, totalizando 40 cupins por tratamento no segundo ensaio.

4.6 Aplicação dos produtos para controle

Realizaram-se três aplicações com intervalo de 24 horas entre cada uma delas. As aplicações foram feitas com o auxílio de bombas de pulverização manuais, seguindo as recomendações técnicas para a preparação das caldas (Tabela 1).

Tabela 1- produtos e dosagens utilizadas no controle de *Cornitermes cumulans* em laboratório. Ituiutaba, MG, FEIT-UEMG, 2009.

Tratamentos	Produto Comercial (g)	Calda Pronta (g/100mL de água)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Metarril	16 gramas
Fipronil	Regent 800 WG	4 gramas
<i>M. anisopliae</i> + fipronil	Metarril + Regent 800 WG	8 gramas + 2 gramas

Anteriormente às aplicações, foi contabilizado o número de indivíduos mortos e a condição dos demais insetos.

4.7 Ensaaios

O trabalho constituiu-se de dois ensaios. O primeiro com o objetivo de avaliar o meio de cultura mais eficiente na reprodução do *M. anisopliae* e o segundo, foi realizado a fim de comparar o fungo obtido no laboratório da Instituição com os produtos Metarril e Regent 800 WG®, além da combinação entre estes dois últimos.

Primeiro ensaio:

- BDA acrescido de sacarose com Metarril diluído e inoculado em 3 tubos de ensaio;
- BDA acrescido de sacarose com Metarril em pó e inoculado em 3 tubos de ensaio;
- BDA acrescido de sacarose com Metarril diluído e inoculado em 2 placas de Petri;
- BDA acrescido de sacarose com Metarril em pó e inoculado em 3 placas de Petri;
- BDA comum com Metarril diluído e inoculado em 3 tubos de ensaio;
- BDA comum com Metarril em pó e inoculado em 3 tubos de ensaio;
- BDA comum com Metarril diluído e inoculado em 2 placas de Petri;
- BDA comum com Metarril em pó e inoculado em 3 placas de Petri.

Segundo ensaio:

- Testemunha (água destilada);
- Aplicação de Regent 800 WG;
- Aplicação de Metarril;
- Aplicação de Regent 800 WG+Metarril;
- *Metarhizium anisopliae* obtido em laboratório.

4.8 Avaliação de infecção

Após a terceira e última aplicação os microorganismos desenvolvidos nos tratamentos nos respectivos tratamentos foram levados ao microscópio para identificação de suas estruturas com o auxílio da coloração azul de aman (JOHANSEN, 1940), a fim de confirmar a presença de fungos. Após 5 dias da primeira aplicação os cupins desses tratamentos também foram observados na lupa para verificar a presença ou não, de fungos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio não houve desenvolvimento do *Metarhizium anisopliae* em nenhum tubo de ensaio, foram identificadas somente colônias de

microorganismos leitosos semelhantes a bactérias. Nas placas de Petri houve o surgimento de diferentes colônias de microorganismos, entre elas o *Metarhizium anisopliae*, nas placas com BDA acrescido de sacarose. Em duas dessas placas o *M. anisopliae* apresentou pouco desenvolvimento, enquanto noutra, o fungo completou seu desenvolvimento, apesar de ter ocorrido contaminação por bactérias (Figura 2). O fungo apresentou coloração e o anelamento característico da espécie, conforme cita Macedo (2005). Nas placas que continham apenas BDA não houve o aparecimento do fungo.

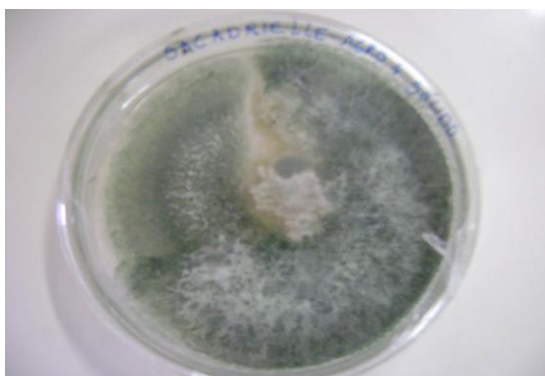


Figura 2. Desenvolvimento completo do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura BDA acrescido de sacarose. Ituiutaba, MG, FEIT-UEMG, 2009.

No segundo ensaio os cupins de dois tratamentos morreram imediatamente após a aplicação dos tratamentos contendo Regent 800 WG, puros ou com Metarril. Esse resultado concorda com Macedo (1995) que confirmou a rapidez da eficiência do fipronil no controle de cupins. Isto foi diferente da situação observada no tratamento constituído apenas por Metarril, o qual apresentou indivíduos vivos, mesmo após 24 horas subsequentes à primeira aplicação. Os indivíduos submetidos ao tratamento com *M. anisopliae* multiplicado em laboratório, apresentaram 100% de mortalidade quando avaliados após 24 horas de contato com o fungo entomopatogênico (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da presença de fungos sobre os cupins nos tratamentos com Metarril ou *M. anisopliae* e taxa de infecção nos indivíduos em cada repetição. Ituiutaba, MG, FEIT-UEMG, 2009.

Tratamentos	Repetições	Número de indivíduos		
		Infectados	Não infectados	Taxa de infecção (%)
Metarril (Itaforce)	1	2	8	20
	2	8	2	80
	3	9	1	90
	4	8	2	80
<i>M. anisopliae</i> + Fipronil	1	0	10	0
	2	5	5	50
	3	3	7	30
	4	4	6	40
<i>M. anisopliae</i> Multiplicado em laboratório.	1	5	5	50
	2	10	0	100
	3	5	5	50
	4	3	7	30

Após cinco dias da primeira aplicação, os cupins foram observados na lupa para verificação da presença de fungos sobre eles (Tabela 2). Os dados obtidos demonstraram que é possível o desenvolvimento do fungo *M. anisopliae* mesmo em meios onde há a presença do fipronil (Figura 3), conforme o que é apresentado pela empresa Itaforce (2009), que afirma que o fungo tem compatibilidade com diversos produtos fitossanitários e só não se desenvolve em meios com fungicidas químicos.



Figura 3. Identificação de estruturas fúngicas em microscópio com coloração azul de aman, encontradas nos tratamentos com Fipronil. Ituiutaba, MG, FEIT-UEMG, 2009.

Todos os tratamentos que receberam o fungo *M. anisopliae*, apresentaram desenvolvimento de estruturas que, quando analisadas ao microscópio, confirmou-se serem estruturas fúngicas, mais precisamente hifas (Figura 3). Tal confirmação demonstra que o fungo estabeleceu-se nestes ambientes e possuía condições para desenvolver-se completamente e colonizar os cupins encontrados nas placas (Figura 4).



Figura 4. Desenvolvimento do *M. anisopliae* em meio com fipronil. Ituiutaba, MG, FEIT-UEMG, 2009.

Os resultados concordam com a empresa Itaforte (2009) quando afirma que é possível o desenvolvimento do fungo *M. anisopliae* mesmo em meios onde há a presença de inseticidas, e que o fungo tem compatibilidade com diversos produtos fitossanitários, salvo os meios com fungicidas químicos. A vantagem da interação entre esses inseticidas está na garantia de que o produto biológico permanecerá na colônia do inseto por um período maior de tempo, uma vez que hábitos comportamentais como o canibalismo será reduzido drasticamente pela repulsão que o inseticida químico causará em certos indivíduos (ALVES; MOINO JUNIOR, 1998). Além disso, o emprego do MIP, nesse caso, reduz significativamente os custos, pois a concentração de ambos os produtos será menor e serão necessárias menos aplicações para controle efetivo da praga. Os dados obtidos sobre a infecção dos cupins (Tabela 3), foram submetidos ao teste Qui-Quadrado com nível de significância a 5%. Após a análise pôde-se observar que o tratamento com Metarril diferenciou-se significativamente dos

demaís. Isto indica que o produto exerce um controle mais efetivo, que o fungo se desenvolve mais rápido quando aplicado sozinho e não em conjunto com produtos químicos. Possivelmente, a explicação pode ser devido a existência de alguma molécula que retarde o aparecimento e desenvolvimento do *M. anisopliae*, em condições de laboratório, conforme observado por Alves et al. (1998).

Tabela 3 – Comparação estatística através do teste de Qui-Quadrado entre as taxas de infecção dos cupins em cada tratamento sem e com a presença do fungo *M. anisopliae*. Ituiutaba, MG, FEIT-UEMG, 2009.

Tratamentos	Infectados $\bar{X} \pm DP$ (n)	χ^2 (C)
Água	0,0 (40)	-
Fipronil	0,0 (40)	-
Fungo	$6,75 \pm 2,77$ (40)	17,200*
Fungo + Fipronil	$3,00 \pm 1,87$ (40)	12,000ns
Fungo (Laboratório)	$5,75 \pm 2,58$ (40)	11,600ns
CV(%)=58,20	$\chi^2(t)=16,918$	

O tratamento com o *M. anisopliae* produzido nas dependências da universidade, pode não ter apresentado significância de infecção provavelmente por encontrar-se em fase de adaptação nas placas (fase “lag”) o que concorda com Madigan et al., (2003).

Apesar do tratamento de fungo e Fipronil ter-se mostrado melhor em relação aos outros no que diz respeito ao nível de infecção dos cupins em menor espaço de tempo, não desaponta os demais resultados. Os outros tratamentos obtidos com os demais produtos podem ser considerados válidos caso o controle desejado não seja imediato ou caso seja um controle preventivo.

6 CONCLUSÕES

O meio-de-cultura mais eficiente para reprodução do fungo é o BDA acrescido de sacarose em placas de Petri. O tratamento com o produto Metarril mostrou-se mais eficiente no nível de infecção dos cupins em menor espaço de tempo em relação ao *M. anisopliae* reproduzido na Instituição e o tratamento com Metarril+Regent 800 WG. É possível a utilização de Regent 800 WG e Metarril

no controle do *C. cumulans*, porém a ação sinérgica dos produtos ocorre lentamente.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. Mortalidade de *Heterotermes tenuis* (Hagen) atraídos por armadilhas com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e imidacloprid. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25: 507-512. 1998.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M.P. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. *Ecossistema*, v. 14. Piracicaba - SP: FEALQ, 1989. 188-192 p.

ALVES, S. B et al. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba - SP: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S. B.; MOINO JR. A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. p. 217-238. São Paulo - SP: Fealq. 1998. 1163 p.

ANDREI, E. Compêndio de defensivos agrícolas. 5. ed. São Paulo - SP, Organização Andrei Editora Ltda. 1996. 506 p.

ARRIGONI, E.B.; ALMEIDA, L.C.; KASTEN JR. P.; PRECETTI, A. A. C. M. Distribuição de espécies de cupins, em cana-de-açúcar, em unidades cooperadas das regiões de Jaú e Sertãozinho. *Bol. Téc. Copersucar*, v. 48, p. 38-47, 1989.

AZEVEDO, J.L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Controle Biológico. v. 1. Jaguariúna - SP: Embrapa, 1998. 264 p.

BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; ALVES, E.B.; AGUIAR, J.C. Controle de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) por fipronil e seu efeito sobre *Beauveria bassiana*. *Arq. Inst. Biol.* 63: 47-51. 1996.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B; ALVES, L. F. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. In: Controle microbiano de insetos. Piracicaba - SP: FEALQ, 1998. 1163 p.

BENTO, J.M et al. Controle Biológico no Brasil. São Paulo - SP: Manole, 2002, 635 p.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; FARIA, M. R. Insect defense mechanisms against microorganisms. p. 249-257. In: Simpósio de Controle Biológico, 6.

Anais: conferências e palestras. Foz do Iguaçu - PR, Embrapa/CNPSo. 1996. 448 p.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host cuticle. *Entomol.* 54: 1795-1805, 1998.

CLAUSEN, C.P. Biological control of insects pests in the continental United States. Washington, USDA, 1956. 151 p.

COUTINHO, H. L. C. Diversidade microbiana e agricultura sustentável. WORKSHOP BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS. Campinas - SP 1996. 17 p.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological research*, v. 104, n. 2, 2000. 134-150 p.

ELZEN, G. W.; ELZEN, P. J.; KING, E. G. Laboratory toxicity of insecticide residues to *Orius insidiosus*, *Geocoris punctipes*, *Hippodamia convergens* e *Chrysoperla carnea*. *Southwestern Entomologist*. Dallas, v. 23, p. 335-343, 1998.

FERNANDES, P. M. Controle biológico de cupins em pastagens. In: Ciclo de palestras sobre controle biológico de pragas. Campinas - SP, 1993. 31-39 p.

FERNANDES, P. M.; CZEPAK, C.; VELOSO, V. R. S. Cupins de montículos em pastagens: prejuízo real ou praga estética? In: FONTES, L. R.; BERTI FILHO, E. (Eds.). Cupins, o desafio do conhecimento. Piracicaba - SP: FEALQ, 1998, 512 p.

GALLO, D. (in memorian); NAKANO, O; [...] et al. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba -SP: FEALQ, 2002, 920 p.

GREATHEAD, D. J.; GREATHED, S. D. Parasitoids in classical biological control. In: WAAGE, J. K. *Insects parasitoids*. New York, Academic Press, 1992. 389 p.

ITAFORTE. Mato Grosso do Sul, 2009. Disponível em: <<http://www.bio55.kit.net/metarril.html>>. Acesso em: 8 de novembro de 2009.

JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

LEITE, L. G et al. Produção de fungos entomopatogênicos. Piracicaba - SP: FEALQ, 2003, 92 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock, Biology of microorganisms. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, E.U.A. 2003.

MARQUES, E. J.; VILLAS BOAS, A. M.; PEREIRA, C. E. F. Orientações para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) em laboratórios setoriais. Piracicaba - SP: Planalsucar, 1981. 23 p.

MACEDO, N. Atualização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. In: BERTI FILHO, E; FONTES, L. R. (Eds.). Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins. Piracicaba - SP: FEALQ, 1995. p. 121-126.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M.; CASALI, I. J.; RIBEIRO, L. D. Controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera; Rhinotermitidae) em dois cortes de cana-de-açúcar. In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16. Resumos. Salvador - BA: SEB, 1997. p. 190.

MACEDO, D. Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Manaharva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. Piracicaba - SP, SP: ESALQ, 2005. 104 p.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. v. 2. Jaguariúna - SP: Embrapa, 2000. 388 p.

MOINO JUNIOR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V. H. P. (Ed). Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras - MG: UFLA, 2000, 207 p.

NETO, S. S. Controle biológico de insetos. Campinas - SP: Fundação Cargil, 1988, 115 p.

SOARES, J. J.; BUSOLI, A. C. Efeito de inseticidas em insetos predadores em culturas de algodão. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília - DF: 2000, v. 35, n. 9, p. 1889-1894.

SOPER, R. S.; WARD, M. G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAIVIZAS, G.C. (Ed). Biological control in crop production. New York: Allanhed e Osmun Publ. 1981, 161-180 p.

TILLMAN, P. G.; SCOTT, W. Susceptibility of *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) to field rates of selected cotton insecticides. Journal of Entomological Science, Athens, v. 32, n. 3, p. 303-310, 1997.

VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. Naturally occurring biological control and integrated control. p. 165-184. In: VAN DEN

BOSCH, R. (ed.) An introduction to biological control. New York, Plenum Press,

1982. 247 p.

ZECK, W. M. Synergism between a new insecticide and entomophagous fungi in the control of subterranean termites. p. 304. In: Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, 25. Abstracts. Heidelberg, Society for Invertebrate Pathology, 1992, 325 p.

ZIMMERMAN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, v. 37, 1993. 375-379 p.

AUTORES

Adrielle Gonçalves de Oliveira é acadêmica do Curso de Agronomia da Fundação Educacional de Ituiutaba, associada à Universidade do Estado de Minas Gerais, Campus de Ituiutaba-MG.

adrielle_oliveira1@yahoo.com.br

José Maria Franco de Assis é engenheiro agrônomo, professor adjunto dos cursos de Agronomia, Ciências Biológicas, Química e Tecnologia em Produção Sucroalcooleira da Fundação Educacional de Ituiutaba, associada à Universidade do Estado de Minas Gerais, Campus de Ituiutaba-MG.

Jassis2@yahoo.com.br