

ANTAGONISMO “IN VITRO” DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* AO FITOPATÓGENO *FUSARIUM* SPP. EM CANA-DE-AÇÚCAR.

Ozania Felizardo de Oliveira (1); Roberto Balbino da Silva (2); Márcia Helena Pontieri (1); Márcia Aparecida Cezar (1).

(1) Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – ozanyafelizardo@hotmail.com

(2) Associação dos Plantadores de Cana da Paraíba – ASPLAN - PB

Resumo

No Estado da Paraíba a cana-de-açúcar constitui-se no maior produto agrícola produzido, porém problemas fitossanitários como as podridões no colmo limitam a qualidade de produção, ocasionam inversão de sacarose e diminuem o rendimento no processamento da cana. Atualmente o manejo das podridões utiliza fungicidas, e uma das alternativas ecológicas para reduzir o impacto de tais produtos no ambiente é o controle biológico. Entre os fungos usados no controle biológico de pragas, *Metarhizium anisopliae* apresenta-se como um agente microbiano de extrema importância. Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* sobre patógenos causadores das podridões da cana-de-açúcar. O fungo *M. anisopliae*, foi fornecido pela Associação dos Plantadores de Cana (ASPLAN). Para confirmação do agente causal da podridão em cana-de-açúcar colmos da variedade RB92579 com sintomas de perfuração e podridão foram submetidos ao isolamento indireto. Experimento de inibição *in vitro* em cultivo pareado foi conduzido com o fungo *Fusarium* spp. em placas de Petri de 90 x 15 mm, com meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de antibiótico, onde foi inoculado um disco de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio do antagonista *M. anisopliae* e mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. a 26°C, após cinco dias procedeu-se a inoculação das placas com o fungo *Fusarium* spp. As avaliações do antagonismo foram realizadas aos 5, 7, 9 e 11 dias. O delineamento utilizado foi constituído de três tratamentos e seis repetições: 1: *Metarhizium anisopliae* pareado com *Fusarium* spp. (T1); 2 *M. anisopliae* (T2); 3: *Fusarium* spp. (T3). Os dados provenientes das áreas médias das colônias de *M. anisopliae* e *Fusarium* spp. foram submetidos ao teste T com 5% de probabilidade para cada dia de amostragem. Foi verificada uma redução significativa de 52,2 % no diâmetro do patógeno *Fusarium* spp. na presença do fungo de biocontrole *M. anisopliae*. Houve a formação do halo de inibição e esse se manteve por todo o período de incubação. O diâmetro de *M. anisopliae* não apresentou redução frente ao patógeno. Estudos futuros avaliando o efeito *in vivo* de *Metarhizium* sobre *Fusarium* em cana-de-açúcar serão de extrema importância para avaliar diferentes variedades, e concentrações do fungo, bem como a forma e planejamento de aplicação.

Palavras-chave: *Saccharum*, doenças, biocontrole.

Introdução

O cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) representa uma das principais culturas da economia brasileira. A área colhida no Brasil destinada à atividade sucroalcooleira, na safra 2016/17, está estimada em 9.110,9 milhões de hectares, um aumento de 5,3% em relação à safra passada. Na Paraíba os registros da última safra apresentaram uma produtividade média de 44.327 kg/ha, com uma produção de 5.532,5 milhões de toneladas (CONAB, 2017), constituindo-se no maior produto agrícola produzido no Estado (IBGE, 2017).

Apesar do elevado potencial para aumento da produtividade da cultura, problemas fitossanitários como o surgimento de pragas e doenças na lavoura causam prejuízos importantes à cultura. Dentre as principais doenças que atacam a cana-de-açúcar destacam-se as podridões no colmo. Estas doenças ocorrem em épocas quentes e chuvosas, podendo incidir de maneira drástica nas folhas, toletes e principalmente em colmos, prejudicando a produção e a qualidade do produto para a comercialização e a industrialização (TOKESHI e RAGO, 2005).

A podridão vermelha causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum* ocasiona prejuízos importantes à cultura, sobretudo pela inversão de sacarose, o que diminui o rendimento no processamento da cana. São frequentes os relatos de perdas de 50% a 70 % de sacarose em colmos atacados simultaneamente pelo fungo e pela broca da cana (*Diatraea saccharalis*), pois ao perfurar o colmo ela abre caminho para a entrada do fungo (SANTIAGO e ROSSETTO, 2010). Outra doença bastante prejudicial à qualidade da sacarose na cana-de-açúcar é a podridão de Fusarium, ocasionada pelo fungo *Fusarium moniliforme* que nos orifícios da broca da cana, o fungo pode se instalar isoladamente ou em associação com a podridão vermelha (TOKESHI e RAGO, 2005). Ambos patógenos são considerados agressivos, podem infectar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento e podem ser encontrados em diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar.

Atualmente para o manejo das podridões são utilizados fungicidas, no entanto não existem produtos registrados para essas doenças na cana-de-açúcar (MAPA, 2017). É comum a utilização de produtos indicados para outros patógenos, o que conseqüentemente pode levar a resistência do patógeno ao produto. Além disso, essa prática utilizada de forma irracional promove efeitos devastadores no ambiente e na saúde, como a contaminação de alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação dos agricultores; a resistência de patógenos, de pragas e plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos (MORANDI e BETTIOL, 2009).

Uma das alternativas ecológicas para reduzir o impacto dos agrotóxicos, é o controle biológico (VINALE et al., 2008) que consiste na utilização de agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos.

Entre os fungos usados no controle biológico de pragas ou com potencialidade para tanto, o fungo *Metarhizium anisopliae* apresenta-se como um agente microbiano de extrema importância dentro do programa de controle biológico (GARCIA, 2008). De grande importância no Brasil e no mundo, o gênero *Metarhizium* destaca-se como um importante agente para o controle de pragas, ocorrendo naturalmente em mais de 300 espécies de insetos, pode ser encontrado em solos de habitats variados do mundo inteiro (ZIMMERMANN, 2007). Este fungo também tem sido estudado para o controle de insetos vetores de doenças em humanos por alguns grupos de pesquisa (MNYONE et al. 2009).

No Brasil, este fungo vem sendo utilizado no controle biológico de percevejos das pastagens, da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*, da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, e carrapatos de impacto na pecuária, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ORLANDELLI e PAMPILLE, 2011). Nos estados do Nordeste, *M. anisopliae* seu uso é empregado com grande sucesso no controle da cigarrinha na cultura da cana-de-açúcar correspondendo a um dos mais bem-sucedidos programas de controle biológico na América Latina (ALVES e LOPES, 2008).

No Estado da Paraíba a produção do agente de biocontrole é feita pela Associação dos Plantadores de Cana (ASPLAN-PB) a qual orienta os produtores na utilização de *M. anisopliae* no manejo da cigarrinha da folha em cultivos de cana-de-açúcar, porém pouco se sabe sobre o seu efeito nos fungos causadores de podridões. Um estudo para verificar a eficiência de *M. anisopliae* sobre tais patógenos é de extrema importância, uma vez que se constitui em método biológico, alternativo e sem contraindicações ambientais.

Nesse sentido, objetivou-se com essa pesquisa avaliar o efeito "in vitro" do agente de biocontrole *Metarhizium anisopliae* sobre *Fusarium* um dos patógenos causadores das podridões da cana-de-açúcar.

Metodologia

Obtenção de *Metarhizium anisopliae*

O agente de biocontrole *Metarhizium anisopliae* utilizado no estudo, foi fornecido pela Associação dos Plantadores de Cana da Paraíba (ASPLAN), isolado denominado IB-Campinas-SP sob o código IBCP-425.

Isolamento do agente causador da podridão do colmo da cana-de-açúcar

Colmos da variedade RB92579 de cana-de-açúcar provenientes da Fazenda Experimental da ASPLAN situada em Mamanguape – PB, apresentando sintomas de perfuração e podridão, foram utilizados para o isolamento indireto do agente causador da podridão. Para confirmação da presença do patógeno nas amostras de cana-de-açúcar, estas foram submetidas ao isolamento (ALFENAS e MAFIA, 2007), onde foram retirados pequenos fragmentos superficiais das margens das lesões. Em seguida foi feita a desinfestação superficial em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por um minuto e duas lavagens em água destilada esterilizada, dispostos em papel filtro esterilizado para secar, seguido do plaqueamento em meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de antibiótico na dose 0,03 g/L. As placas foram mantidas à temperatura de 26°C durante sete dias, seguida da identificação com o auxílio de um microscópio óptico e visualização das características morfológicas, tais como as estruturas reprodutivas (esporos), culturais como pigmentação e estrutura do micélio.

Teste de antagonismo “*in vitro*” de *Metarhizium anisopliae* a *Fusarium* spp.

Os ensaios da capacidade antagônica de *Metarhizium anisopliae* ao patógeno *Fusarium* spp. previamente identificado no isolamento foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) através do cultivo pareado dos microrganismos “*in vitro*” em placas de Petri de 90 x 15 mm.

Em cada placa de Petri contendo meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de antibiótico na dose 0,03 g/L foi inoculado um disco de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio do antagonista *M. anisopliae*. Após cinco dias de incubação em câmara climatizada tipo B.O.D. a 26°C, um disco (0,5 cm) do fitopatógeno *Fusarium* spp., foi inoculado na outra extremidade da placa, seguindo a metodologia de Siqueira (2016).

Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em B.O.D. (26°C) por mais 11 dias para a observação do antagonismo. A avaliação do diâmetro das colônias tanto de *M. anisopliae* como de *Fusarium* spp. foram realizadas aos 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação do fitopatógeno. O cálculo da porcentagem de inibição (SASAN e BIDOCHKA, 2013) foi feito utilizando a fórmula: $PIC (\%) = [(crescimento\ do\ controle\ positivo - crescimento\ do\ tratamento) \times 100] / Crescimento\ do\ controle\ positivo$.

Uma avaliação categórica para o antagonismo foi feita utilizando a escala descrita por Bell et al., (1982) com adaptações (SIQUEIRA, 2016), onde: **Categoria A:** Sem nenhum controle, o fungo fitopatogênico cresce por cima do *M. anisopliae* (0); **Categoria B:** O fungo fitopatogênico cresce até o limite da colônia de *M. anisopliae*, mas não por cima desta (+); **Categoria C:** Há a formação do halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação (++); **Categoria D:** Há o retardo no desenvolvimento micelial do fitopatógeno, mas no fim do período de incubação o mesmo se desenvolve por cima de *M. anisopliae* (+/-); **Categoria E:** Total controle, o fungo *M. anisopliae* cresce por cima do fitopatógeno (X).

O delineamento utilizado foi constituído de três tratamentos e seis repetições, sendo os tratamentos distribuídos da seguinte forma: 1: *Metarhizium anisopliae* pareado com *Fusarium* spp. (T1); 2 *Metarhizium anisopliae* (T2); 3: *Fusarium* (T3). Os dados provenientes das áreas médias das colônias de *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium* spp. foram submetidos ao teste T com 5% de probabilidade para cada dia de amostragem. Esta abordagem foi realizada a fim de verificar a partir de qual dia o *Metarhizium* sp. passa a afetar o crescimento do *Fusarium* spp.

Resultados e discussão

Isolamento do agente causador da podridão do colmo da cana-de-açúcar

A técnica de isolamento indireto e análise das características morfológicas identificou o agente causador da podridão como pertencente ao gênero *Fusarium* spp. O isolado obtido apresentou crescimento rápido e coloração róseo a púrpura. Os aspectos gerais do gênero *Fusarium* é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à purpura escuro ou do creme à laranja) (DOMSCH et al.,1980).

Patógenos como *Fusarium* são classificados como necrotróficos, ou seja, destroem os tecidos vegetais por meio da ação de toxinas ou enzimas que promovem a lise e morte da célula hospedeira, permitindo o acesso a nutrientes e o crescimento do patógeno (AGRIOS, 2005). Geralmente tais patógenos têm capacidade de sobreviver por longos períodos nesse ambiente por meio da formação de estruturas de resistência, as quais garantem condições ideais na ausência da planta hospedeira.

Na cana-de-açúcar ocasiona a podridão-vermelha do colmo, reduzindo o teor de açúcar nos colmos devido à inversão da sacarose armazenada na planta, e, como consequência

ocasiona a contaminação do caldo, prejudicando assim a qualidade dos produtos (DINARDO-MIRANDA, 2008).

Teste de antagonismo “*in vitro*” de *Metarhizium anisopliae* a *Fusarium* spp.

Foi verificada uma redução significativa do diâmetro do patógeno *Fusarium* spp. na presença do fungo de biocontrole *M. anisopliae*, já a partir do 5^o dia de amostragem (Figura 1).

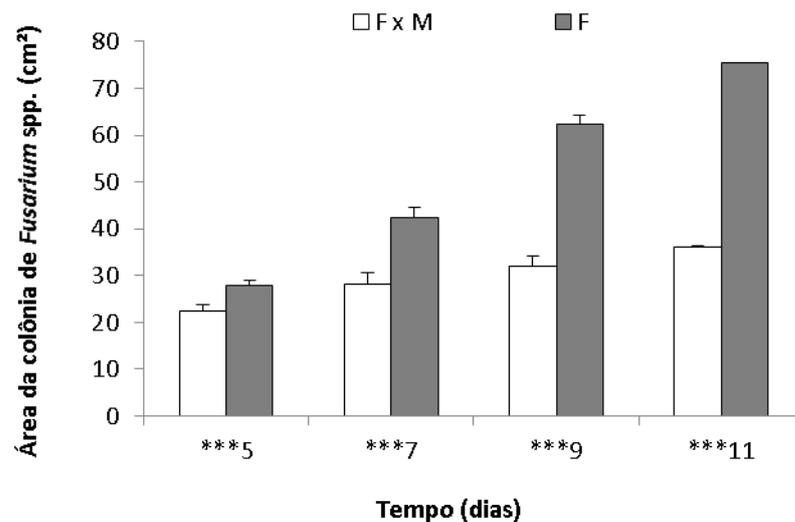


Figura 1: Efeito antagônico do *Metarhizium anisopliae* contra o *Fusarium* sp. (FxM em branco) e o seu respectivo controle (F em cinza). Teste T: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

O estudo da capacidade antagônica de *Metarhizium* à fitopatógenos é recente e vem demonstrando resultados promissores. Um estudo realizado com *Metarhizium robertsii* e o fitopatógeno, *Fusarium solani*, causador da podridão da raiz de feijão demonstrou a formação de uma pequena zona de inibição quando ambos os fungos foram cultivados “*in vitro*” (SASAN e BIDOCHKA, 2013). O antagonismo das espécies *M. brunneum*, *M. robertsii* e *M. flavoviridae* ao fitopatógeno *Fusarium culmorum* proporcionou diferentes tamanhos de zona de inibição (KEYSER et al., 2014).

No Brasil um estudo avaliando diferentes isolados de *Metarhizium* spp. demonstrou a capacidade de antagonismo aos fitopatógenos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme* (SIQUEIRA, 2016). Segundo a autora os resultados obtidos mostraram que todas as espécies de *Metarhizium* testadas foram capazes de inibir o crescimento de *F. moniliforme* e *C. falcatum*, sendo a melhor espécie foi *M. robertsii*, que proporcionou até 54% de inibição para ambos fitopatógenos.

Esse resultado é muito semelhante ao obtido na presente pesquisa que consistiu numa inibição de 52.2 % (desvio padrão = 1.5%) da colônia do patógeno na presença do biocontrole, no último dia de amostragem.

Ao término do experimento *in vitro* o antagonismo também foi avaliado seguindo os critérios adotados por Bell et al. (1982) com adaptações (SIQUEIRA, 2016) sendo atribuída a Categoria C, ou seja, há a formação do halo de inibição e esse se mantém por todo o período de incubação. Esta categoria também foi atribuída nos experimentos realizados por Siqueira (2016) que verificou, para o antagonismo a *F. moniliforme*, 60% dos isolados de *Metarhizium* spp. se enquadram na categoria “C”, demonstrando que os experimentos de antagonismo pelo método de cultivo pareado mostraram que todos os isolados de *Metarhizium* spp. apresentaram alguma forma de antagonismo contra o fitopatógeno *F. moniliforme*.

Não foi verificada diferença significativa do diâmetro do fungo biocontrole *Metarhizium* sp., na presença e ausência do patógeno *Fusarium* spp. (Figura 2) demonstrando que de fato houve a inibição ao fitopatógeno testado (Figura 3).

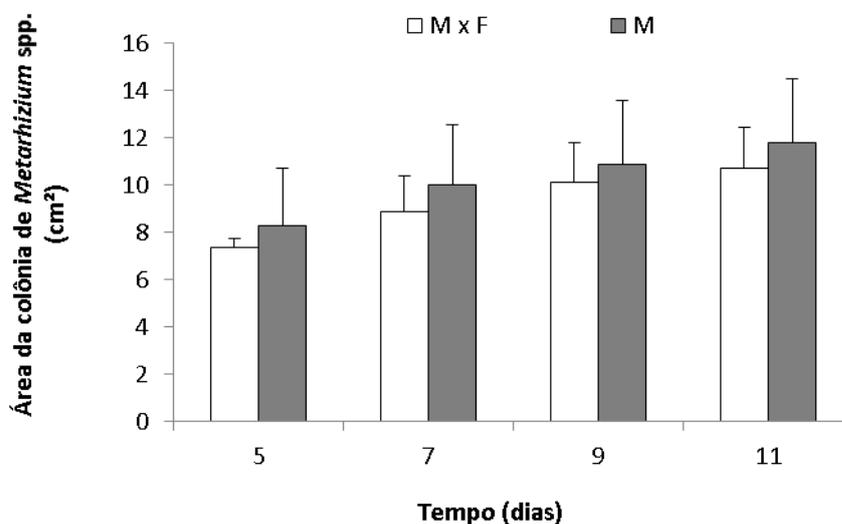


Figura 2: Crescimento da colônia de *Metarhizium anisopliae* na presença (FxM em branco) e ausência de *Fusarium* spp. (F em cinza).

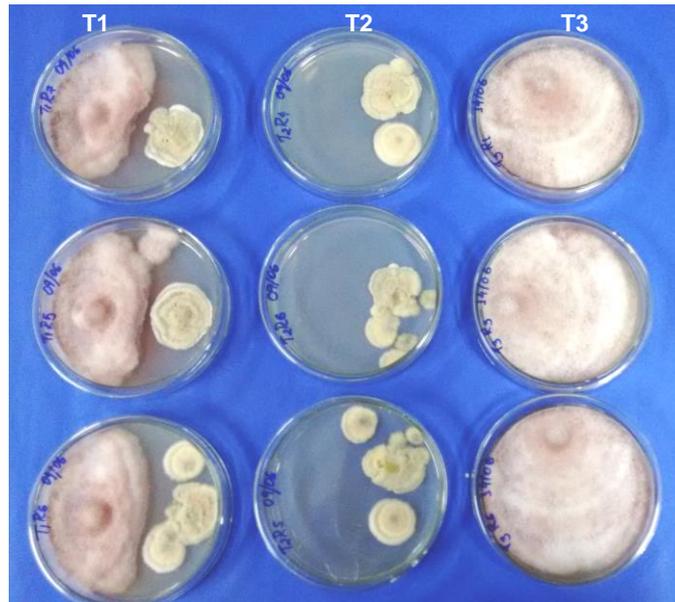


Figura 3: Antagonismo “in vitro” de *Metarhizium anisopliae* pareado com *Fusarium* spp. (T1); *Metarhizium anisopliae* (T2) e *Fusarium* (T3).

Os resultados obtidos neste projeto representam o segundo relato de antagonismo de *Metarhizium anisopliae* a fitopatógenos, no Brasil, em cana-de-açúcar, e de acordo com os estudos desenvolvidos por Siqueira (2016), anteriormente apenas dois trabalhos haviam verificado seu feito antagônico no entanto com outras espécies de *Metarhizium* (*M. robertsii*, *M. brunneum* e *M. flavoviridae*).

Outro aspecto importante é a viabilidade técnica da sua utilização, como citado anteriormente, o fungo já vem sendo cultivado e utilizado em cultivos de canaviais situados na Paraíba, no controle de pragas e certamente poderá ser ampliado seu uso e potencial de biocontrole de podridões em cana-de-açúcar, para tanto pesquisas envolvendo a forma de aplicação nos colmos e avaliação dos efeitos sobre o patógeno serão imprescindíveis para ampliar sua utilização.

Conclusões

O isolado IBCP-425 de *Metarhizium anisopliae* inibiu “in vitro” *Fusarium* spp., afetando mais de 50% seu crescimento.

Estudos futuros avaliando o efeito “in vivo” de *Metarhizium* sobre *Fusarium* em cana-de-açúcar em campo serão de extrema importância para avaliar diferentes variedades, e concentrações do fungo, bem como a forma e planejamento de aplicação.

Fomento

Universidade Federal da Paraíba – UFPB pela concessão de bolsa de iniciação científica.

Referências

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**, UFV, 2007, p.382, Viçosa.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**, FEALQ, 2008, Piracicaba.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Ed. 5, Elsevier, 2005, San Diego.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 397-382, 1982.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra Brasileira, cana-de-açúcar. V. 3 - SAFRA 2016/17- N.3 - **Terceiro levantamento**, Brasília, abril 2017. Pesquisado em 10 de abril de 2017 <http://www.conab.gov.br>.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, G. A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**, Campinas: Instituto Agrônomo, cap. 17, p. 349-404, 2008.

DOMSCH, K.H; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. Academic Press, 1980, New York.

GARCIA, M. V. Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* em pastagem visando o controle do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos. Tese de Doutorado em Microbiologia Agropecuária, FCAV, Jaboticabal, 2008, 45 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2014_v41_br.pdf. Acesso em 18 de ABRIL de 2017.

KEYSER, C. A.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N.V. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. **Fungal Ecology**, London, v. 11, p. 122-133, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Cana-de-açúcar. Brasília, setembro 2017. Pesquisado em 28 de setembro de 2017 http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Jaguariúna, Embrapa Meio ambiente, 2009.

MNYONE, L. L.; RUSSEL, T. L.; LYIMO, I. N.; LWETOIJERA, D. W.; KIRBY, M. J.; LUZ, C. First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *An. Arabiensis* (Diptera: Culicidae). **Parasites e Vectors**, London, v.2, n. 1, p. 59-62, 2009.

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

SANTIAGO, A. D.; ROSSETTO, R. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar> Acessado em 12 de maio de 2016.

SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. Antagonismo of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.35, n. 3, p. 288-293, 2013.

SIQUEIRA, A. C. O. Uso de *Metarhizium* spp. Na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Piracicaba, 2016, 94p.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos *Saccharum* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**, São Paulo, Ceres 2005, v. 2, p. 185-196.

VINALE, F.; SIVASITHAM PARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma* - plant -pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p.1-10, 2008.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, 879, 2007.