

REISOLAMENTO DE *Metarhizium brunneum* EM FOLHAS DE FEIJÃO CAUPI

Emily Mesquita da Silva ¹; Patrícia Silva Gôlo²; Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt²
& Marcia Regina Soares³

1. Bolsista de iniciação científica FAPERJ, Discente do curso de Ciências Biológicas, IB/UFRRJ; 2. Professor DPA/IV/UFRRJ; 3. Professor CT/UFRRJ

Palavras-chave: controle biológico, fungos entomopatogênicos, pragas agrícolas.

Introdução

Metarhizium brunneum é um fungo entomopatogênico pertencente ao filo Ascomycota que apresenta conídios na forma assexuada. Este fungo é identificado pela coloração verde e pela forma cilíndrica dos conídios que se organizam em cadeia formando uma camada densa e compacta de esporos. As diferentes espécies de *Metarhizium* se mostram altamente eficiente no controle de insetos e de carrapatos (testes *in vitro*), podendo ser isolado do solo ou em insetos mortos na agricultura.

Sua ação ocorre geralmente via tegumento, e a morte do hospedeiro é decorrida devido a produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocel, ação histolítica e bloqueio mecânico do aparelho digestivo ocasionado pelo crescimento do micélio e iniciação do processo de esporulação fúngica (ALVES, 1998; NASCIMENTO, 2003). Outras formas de ação do fungo contra insetos vem sendo recentemente exploradas: alguns autores sugerem que quando dentro da planta o fungo ainda poderia causar efeitos negativos em insetos, através da produção de metabólitos tóxicos para insetos (BATTI et al., 2013; GOLO et al., 2014). No presente estudo objetivou-se explorar as possíveis interações que ocorrem entre *Metarhizium* e plantas da espécie *Vigna unguiculata* (feijão Caupi). Já se sabe que outras espécies de fungos entomopatogênicos (viz., *Beauveria bassiana*) são capazes de colonizar plantas, mas as interações entre plantas e *Metarhizium* ainda não estão bem estabelecidas.

Metodologia

Isolados fúngicos e suspensões

O fungo utilizado nos experimentos foi o isolado ARSEF 1095 de *Metarhizium brunneum* cedido pela Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF) Laboratório de Plantas, Solo, e Nutrição (Ithaca, NY, EUA). O isolado foi cultivado em meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI) em placas de Petri (polipropileno, 90 × 15 mm, Fisherbrand) no escuro a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e por 14 dias. Os conídios foram raspados das placas de cultura e suspensos em uma solução de água estéril e Tween 80 a 0,01%. As suspensões foram ajustadas para a concentração de $\times 10^7$ conídios mL⁻¹.

Obtenção de *Vigna unguiculata* e delineamento experimental

Os feijões deste estudo são de procedência da Embrapa Meio-Norte, sementes BRS-ITAM. O plantio foi feito em condicionador de solo Natus Solos do Brasil esterilizado por autoclavagem. As sementes de *Vigna unguiculata* foram divididas em dois grupos: o primeiro, onde 45 sementes foram imersas em suspensão na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹; e o segundo onde 45 sementes ficaram imersas em água destilada. As imersões duraram 1 hora. Após esse período, foram plantadas 3 sementes em cada vaso, que ficaram expostos em ambiente externo, sendo regadas quando necessário. 28 dias depois de plantadas, as folhas do primeiro grupo foram expostas a suspensão fúngica na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹. A exposição foi feita pincelando cada folha (tanto as novas quanto as maduras). As plantas expostas permaneceram em câmara úmida, onde foram envoltas por sacos plásticos e mantidas em temperatura ambiente por 48 horas.

Reisolamento da folhas de *Vigna unguiculata*

Uma semana após a exposição das folhas ao fungo, foram retiradas 5 folhas de 3 plantas diferentes. As amostras foram esterilizadas superficialmente com hidróxido de sódio 0,05% por 2 minutos; etanol 70% por 2 minutos; e água destilada estéril – 3x rinsar (PARSA et al., 2013). Posteriormente, foram recortadas em pequenos quadrados de 0,5 cm aproximadamente e colocadas em meio artificial CTC (FERNANDES et al., 2010). Após o crescimento das colônias, foi feita câmara úmida com amostras, em $27 \pm 1^\circ\text{C}$ UR 80% para análise das estruturas fúngicas e confirmação dos aspectos morfológicos.

Resultados e Discussão

Em uma primeira tentativa de reisolamento de *Metarhizium bruneum*, apenas as folhas das plantas foram expostas ao fungo, utilizando a mesma concentração e metodologia. Entretanto não foi obtido sucesso no reisolamento, visto que as folhas, partes aéreas do vegetal, ficam expostas ao meio ambiente, e vulneráveis a chuvas, radiação solar e outros microorganismos presentes no meio. No presente estudo, no entanto, as sementes também foram expostas ao fungo antes de serem plantadas, e em resposta, foi possível reisolar colônias fúngicas das folhas, mostrando então que a penetração nas sementes e posteriormente nas folhas é o método mais eficiente já que teve mais tempo para interagir com a planta, com menor taxa de competição, de predação e sendo menos atingida por fatores abióticos.

Dez dias após a inoculação das folhas no meio de cultura artificial, foi confirmado o crescimento de colônias do fungo *Metarhizium* spp. (Figura 1), mostrando que o fungo colonizou a planta eficazmente.

Na câmara úmida realizada a partir das colônias fúngicas reisoladas das folhas do feijão caupi, foram observadas características fúngicas microscópicas de *Metarhizium* spp. (TULLOCH, 1976) (Figura 2). O sucesso no reisolamento de *Metarhizium* em feijões amplia as perspectivas de utilização desse fungos entomopatogênicos em pragas agrícolas que se alimentam das plantas, já que alguns autores sugerem que metabólitos secundários produzidos pelo fungo podem causar efeitos negativos na atuação das pragas.

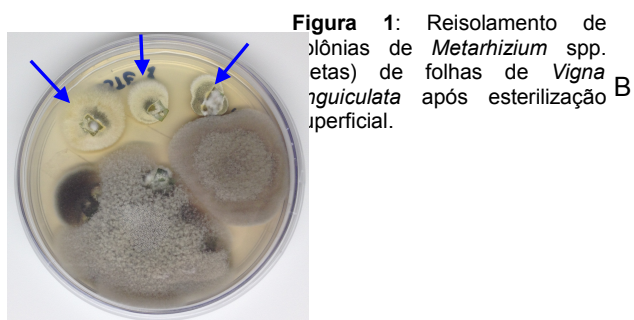


Figura 1: Reisolamento de colônias de *Metarhizium* spp. (etapas) de folhas de *Vigna guiculata* após esterilização superficial.

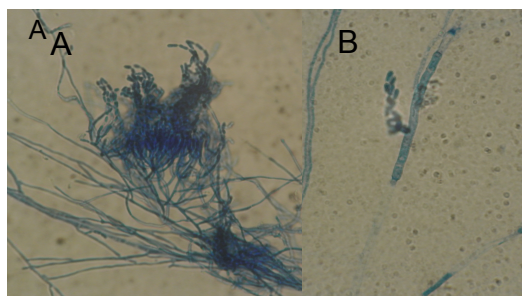


Figura 2: (A e B) Imagem microscópica (400x) de hifas e conídios de *Metarhizium* spp. resultantes de inoculação dos conídios da Figura 1 em câmara úmida.

Conclusão

Conclui-se que o isolado ARSEF 1095 de *Metarhizium bruneum* foi capaz de colonizar folhas de feijão caupi.

Referencias Bibliográficas

- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: S. B. Alves edit. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: FEALQ, p.21-37, 1998b. São Paulo.
- BATTA S, Y.A. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop Protection**. v. 44, p 128-134, 2012.
- FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER, R.N.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p. 197-205, 2010.
- GOLO, P.S.; GARDNER, D.R.; GRILLEY, M.M.; TAKEMOTO, J.Y.; KRASNOFF, S.B.; PIRES, M. S.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Production of Destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. **PLoS ONE**, v .9, p. e104946, 2014.
- NASCIMENTO, F.S.B. **Ação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* e parâmetros biológicos após passagem em *Rhipicephalus sanguineus***. Tese de mestrado. Recife: UFPE, p20. 2003
- PARSA, S., ORTIZ, V., Vega, F.E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: Towards Endophytic biological control. **Journal of Visualized Experiments**. v. 74, 2013.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 66, p. 407–411, 1976.