



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia em Desenvolvimento Regional
Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira



**EFEITO DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE
FUSARIUM SPP. EM CANA-DE-AÇÚCAR.**

Ozania Felizardo de Oliveira

João Pessoa/PB

Junho/2018

Ozania Felizardo de Oliveira

**EFEITO DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE
FUSARIUM SPP. EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão do Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do grau de Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Márcia Aparecida Cezar

João Pessoa/PB

Junho/2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48e Oliveira, Ozania Felizardo de.
EFEITO DE METARHIZIUM ANISOPLIAE SOBRE FUSARIUM SPP.
EM CANA-DE-AÇÚCAR / Ozania Felizardo de Oliveira. –João Pessoa, 2018.
26 f. : il.

Monografia(Especialização) - UFPB/CTDR.

1. : Saccharum spp., podridão vermelha, biocontrole. I. Título

UFPB/BC

EFEITO DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE *FUSARIUM* SPP. EM
CANA-DE-AÇÚCAR.

TCC aprovado em 05/06/18 como requisito para a conclusão do curso de
Tecnologia em Produção Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba.

BANCA EXAMINADORA:



Prof^ª. Dr^ª. Marcia Aparecida Cezar - (UFPB – Orientadora)



Prof^ª. Dr^ª. Solange Maria de Vasconcelos - (UFPB – Membro interno)



Biólogo Roberto Balbino da Silva - (ASPLAN – Membro Externo)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente nas horas difíceis, pois sem ele eu não teria forças para concluir essa longa jornada. Aos meus pais, irmãos e filhos e em especial ao meu esposo que acreditou em mim, pessoa com quem amo partilhar a minha vida. Aos meus amigos e colegas de curso, pelas alegrias e tristezas e dores partilhadas, com vocês as pausas entre um parágrafo e outro foi um alívio para continuar adiante na minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, porque Ele é o meu maior mestre.

À minha família pelo amor, incentivo, apoio e paciência.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Márcia Aparecida Cezar, pela orientação e confiança na elaboração desse trabalho e por todo ensinamento acadêmico ao longo destes anos.

A todos os professores do Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira, que contribuíram e enriqueceram sobremaneira minha vida acadêmica.

À ASPLAN, na pessoa de Roberto Balbino da Silva, que forneceu o agente de biocontrole e a variedade de cana-de- açúcar utilizados na pesquisa do presente trabalho.

Meus agradecimentos aos amigos Wendson Fidelis “In Memoriam”, e Wycleff Hugo, por me ajudarem no início dessa pesquisa.

A todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

Dentre as doenças que limitam a qualidade de produção da cana-de-açúcar, destacam-se as podridões no colmo. Atualmente, o manejo é feito a partir de aplicações de fungicidas. No entanto, não existem produtos registrados para essa doença. O uso de microrganismos antagonistas constitui-se em um método alternativo de controle pois não acarreta contaminações no ambiente e nem para o aplicador. Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito “in vitro” de *Metarhizium anisopliae* sobre *Fusarium* spp., patógeno causador de podridões na cana-de-açúcar. Foi realizado o isolamento indireto do patógeno de colmos da variedade RB92579 com sintomas de perfuração e podridão. Experimento de inibição “in vitro” entre *M. anisopliae* e *Fusarium* foi conduzido em placas de Petri de 90 x 15 mm, em meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de antibiótico, na qual foi inoculado um disco de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio do antagonista 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. O delineamento utilizado foi constituído de três tratamentos e seis repetições. As avaliações foram realizadas em 5, 7, 9 e 11 dias. Verificou-se uma redução significativa de 52,2 % no crescimento de *Fusarium* spp. na presença de *M. anisopliae*. O diâmetro de *M. anisopliae* não apresentou redução frente ao patógeno.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., podridão vermelha, biocontrole.

ABSTRACT

Among the diseases that limit the quality of production of sugarcane, it highlights the red rot. Currently the control is made from fungicide applications, however, there are no products registered for this disease. The use of antagonistic microorganisms constitutes an alternative control method because it does not cause contaminations in the environment nor for the applicator. The objective of this study was to evaluate the “in vitro” effect of *Metarhizium anisopliae* on *Fusarium* spp. Indirect isolation of the stem blight of the variety RB92579 with perforation and rot symptoms was carried out. “In vitro” inhibition experiment between *M. anisopliae* and *Fusarium* was conducted in 90 x 15 mm Petri dishes in a potato-dextrose-agar (BDA) culture medium supplemented with antibiotic, where a 0.5 cm of diameter containing mycelium of the antagonist and kept in a heated room type BOD at 26 ° C, after five days the plates were inoculated with the fungus *Fusarium* spp. The design used consisted of three treatments and six replicates. The evaluations were performed at 5, 7, 9 and 11 days. There was a significant 52.2% reduction in the growth of *Fusarium* spp. in the presence of *M. anisopliae* and the diameter showed no reduction against the pathogen.

Keywords: *Saccharum* spp., red rot, biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Seleção de fragmentos das margens de lesões em colmos de cana-de-açúcar	16
Figura 2 – Método da Confrontação direta (Bell et al., 1982, Adaptado por Siqueira (2016)).	16
Figura 3 – Placas de Petri contendo crescimento micelial de <i>Fusarium</i> spp	18
Figura 4 – Efeito antagônico do <i>Metarhizium anisopliae</i> contra o <i>Fusarium</i> sp. (FxM em branco) e o seu respectivo controle (F em cinza). Teste T: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.	19
Figura 5 – Antagonismo “in vitro” de <i>Metarhizium anisopliae</i> pareado com <i>Fusarium</i> spp. (T1); <i>Metarhizium anisopliae</i> (T2) e <i>Fusarium</i> (T3).....	20
Figura 6 – Crescimento da colônia de <i>Metarhizium</i> sp. na presença (FxM em branco) e ausência de <i>Fusarium</i> sp. (F em cinza)	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipo de controle ou antagonismo por categoria. Adaptada de Bell (1982)	17
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivo	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Importância da cana-de-açúcar	12
2.2 Doenças da cana-de-açúcar	12
2.2.1 Podridão de <i>Fusarium</i>	13
2.3 Utilização de <i>Metarhizium</i> spp. no Controle Biológico	14
3 METODOLOGIA	15
3.1 Considerações Gerais	15
3.2 Obtenção do <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
3.3 Isolamento dos agentes causadores das podridões do colmo da cana-de-açúcar	15
3.4 Teste de antagonismo “in vitro” de <i>Metarhizium anisopliae</i> contra <i>Fusarium</i> spp	16
3.5 Análise Estatística	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Isolamento do agente causador da podridão do colmo da cana-de-açúcar.....	18
4.2 Teste de antagonismo “in vitro” de <i>Metarhizium anisopliae</i> contra <i>Fusarium</i> spp.....	19
5 CONCLUSÃO	22
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	23
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) representa uma das principais culturas da economia brasileira. A área a ser colhida no Brasil de cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira, na safra 2018/2019, deverá atingir 8.613,6 milhões de hectares, representando uma redução de 1,3% em relação ao ocorrido no exercício anterior (CONAB, 2018).

Na Paraíba a previsão da produção de cana-de-açúcar é de 5.866,9 mil toneladas. A safra 2018/19 apresenta previsões favoráveis para as condições climáticas em relação aos últimos cinco anos, com nível de precipitação mais próximo ao ideal. A previsão da safra 2018/19 é de 18,8% de destinação da cana-de-açúcar para produção de açúcar e 81,2% para a produção de etanol, dividido em 48,6% para o anidro e 32,6% para o hidratado (CONAB, 2018).

Apesar do elevado potencial para aumentar a produtividade da cultura, vários problemas fitossanitários limitam a qualidade de produção. O surgimento de pragas e doenças na lavoura causam prejuízos importantes à cultura como é o caso da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), cuja abertura de galerias ocasionada pelas lagartas favorece a penetração de microrganismos. 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, pois ao perfurar o colmo ela abre caminho para a entrada do fungo (SANTIAGO e ROSSETTO, 2017). 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).

A injúria da broca-da-cana e o ataque destes fitopatógenos no colmo caracterizam o sintoma do “complexo broca-podridão”, que acarretam diminuição da pureza do caldo e menor rendimento de açúcar e etanol, além da contaminação do processo de fermentação alcoólica (GALLO et al., 2002). Ambos os 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 têm sido utilizados fungicidas. No entanto, não existem produtos registrados para essas doenças na cana-de-açúcar (AGROFIT, 2018). São utilizados muitas vezes produtos indicados para outros patógenos, o que consequentemente pode levar a resistência do patógeno ao produto. Além disso, essa prática utilizada de forma irracional promove efeitos devastadores no ambiente e na saúde.

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas, doenças e plantas invasoras na agricultura têm, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, 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, além de atuar no controle de doenças e promover respostas positivas em plantas 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. Sua ação é amplamente conhecida, ocorrendo em diversas regiões, desde ambientes de clima temperado até clima tropical (GARCIA, 2008).

1.1 Objetivo

Avaliar o efeito “in vitro” do agente de biocontrole *Metarhizium anisopliae* sobre *Fusarium* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L., é uma gramínea (Família: Poaceae) que tem sido cultivada desde a pré-história. Provavelmente, seu centro de origem é a Polinésia, e suas espécies foram disseminadas por todo o Sudeste Asiático. O cultivo comercial de cana-de-açúcar e de suas variedades ocorre em mais de 70 países e territórios. Brasil, Índia e China são os maiores produtores. O início da indústria açucareira no Brasil se deu em meados do século XIV, início do período colonial, quando foram introduzidas no país mudas de cana-de-açúcar provenientes da Ilha da Madeira, Portugal. O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil está largamente relacionado ao desenvolvimento econômico, sendo o país responsável por 61,8% das exportações mundiais de açúcar (NOCELLI, 2017).

A localização das usinas pelo Brasil se concentra na Zona da Mata, na região Nordeste; no estado de São Paulo, na região Centro-Oeste e na região Centro-Sul. Em geral, as áreas de cultivo da cana-de-açúcar localizam-se num raio de 25 km das usinas, em média, devido ao custo do transporte (A PRODUÇÃO, 2009?).

No Nordeste o maior produtor da cultura é o estado de Alagoas, seguido por Pernambuco e Paraíba, onde as unidades produtivas, no geral, apresentam o direcionamento da moagem em 18,8% para produção de açúcar e os 81,2% para o etanol, dividido em: 48,6% para o etanol anidro e 32,7% para o hidratado (CONAB, 2018).

A Paraíba conta com cerca de 1800 fornecedores de cana-de-açúcar, que enviam sua produção para sete usinas (Japungu, Giasa, Miriri, Agroval, Monte Alegre e Tabu) em funcionamento na safra 2017, no estado. Fornecedores estes, espalhados pelos 26 municípios onde existe cana-de-açúcar. Atualmente 75,48% dos fornecedores de cana-de-açúcar classificam-se como micro produtores, com uma produção de até 1000 (mil) toneladas de cana (USINAS PARAIBANAS, 2017).

2.2 Doenças da cana-de-açúcar

Até hoje foram identificadas 216 doenças que atingem a cana-de-açúcar, sendo que cerca de 58 foram encontradas no Brasil. Dentre estas 58 doenças, pelo menos dez podem ser consideradas de grande importância econômica para a cultura (SANTIAGO e ROSSETTO [2017?]).

Entende-se por doenças em plantas o resultado da interação entre patógeno agressivo e hospedeiro suscetível sob a influência do ambiente. Os fitopatógenos que causam doenças compreendem organismos como fungos, procariotos, vírus e nematoides (WINDHAM e WINDHAM, 2010). Podem produzir, também, novas raças ou variantes que podem ser influenciadas pelas condições ambientais que vencem a resistência e passam a causar novo surto de doença (SANTIAGO E ROSSETTO [2017?]).

Em função disso e das mudanças climáticas, podem surgir surtos epidêmicos, havendo a necessidade de identificar novas doenças da cana e manter uma contínua vigilância dentro dos canaviais, nos níveis estadual e nacional. As principais doenças da cana-de-açúcar são: Escaldadura-das-folhas, Estria vermelha, Raquitismo-da-soqueira, Mosaico, Amarelinho, Ferrugem da cana, Carvão da cana, Mancha parda, Podridão abacaxi, Podridão de *Fusarium* (estudada no presente trabalho) e Podridão vermelha.

2.2.1 Podridão de *Fusarium*

O agente causal da podridão de *Fusarium* (também chamada de Fusariose) como indicado pelo próprio nome é o fungo fitopatogênico *Fusarium moniliforme*, que só infecta a cana a partir de lesões no colmo, pois não têm a capacidade de infecção autônoma (MATSUOKA, 2016); o sintoma característico é o tecido interno do colmo com coloração avermelhada.

Na podridão de *Fusarium*, os tecidos juntos ao orifício sofrem inversão de sacarose, apresentam coloração vermelho-escuro, quase negro, recobrendo alguns milímetros dos tecidos da cavidade ou se estendendo a maiores profundidades do entrenó, no caso de variedades suscetíveis. Através dos feixes vasculares, podem acometer vários entrenós abaixo e acima do orifício causado pela broca (TOKESHI e RAGO 2005).

A Podridão de *Fusarium* também se manifesta nas folhas e colmos da cana-de-açúcar. Esse mesmo fungo pode causar o sintoma *pokkah-boeng*, que se manifesta como manchas cloróticas e esbranquiçadas grandes e irregulares na base das folhas do cartucho, ou seja, acima da bainha, tomam toda a largura da folha, e podem apresentar lesões marrom-avermelhadas, causando com isso rompimento do tecido e deformação; em estado avançado essas lesões encurtam as folhas, as tornam distorcidas, espiraladas e até matam o ponteiro (MATSUOKA, 2016).

Esse sintoma é bastante confundido com a deficiência de boro e podem na maioria das vezes estarem ligados a este fator (SANGUINO, 2009).

Nos colmos os sintomas são muito parecidos com os da podridão vermelha e seu aparecimento está associado a ferimentos químicos ou físicos como aqueles causados por brocas.

A maioria das variedades de cana-de-açúcar é portadora desse patógeno sem expressar sintomas, o controle é feito, quase que exclusivamente, com variedades tolerantes (TOKESHI e RAGO 2005).

2.3 Utilização de *Metarhizium* spp. no Controle Biológico

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, é 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 PAMPHILLE, 2011). Nos estados do Nordeste, *M. anisopliae* vem sendo utilizado 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).

Além dos efeitos significativos sobre diversas pragas, estudos recentes da capacidade antagônica de *Metarhizium* spp. a diversos fitopatógenos vem demonstrando resultados promissores (SIQUEIRA, 2016; SASAN e BIDOCHKA, 2013; KEYSER et al., 2014).

No Estado da Paraíba a produção do agente de biocontrole é feita pela Associação dos Plantadores de Cana-de-açúcar (ASPLAN-PB), a qual orienta a sua utilização em cultivos de cana-de-açúcar no manejo da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata*), 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, esta pesquisa contribui para elucidar se *M. anisopliae* exerce efeito sobre patógenos da cana-de-açúcar e subsidiar estratégias de sua aplicação no manejo de pragas e doenças na cultura.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações Gerais

A pesquisa foi desenvolvida no período de setembro de 2016 a outubro de 2017 no Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), pertencente à Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

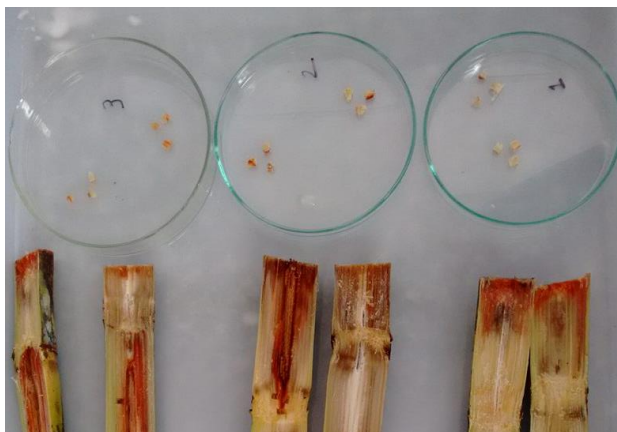
3.2 Obtenção do *Metarhizium anisopliae*.

O agente de biocontrole utilizado na pesquisa foi fornecido pela Associação dos Plantadores de Cana-de-açúcar da Paraíba (ASPLAN), isolado denominado IB-Campinas-SP sob o código IBCB-425.

3.3 Isolamento dos agentes causadores das podridões do colmo da cana-de-açúcar

Colmos da variedade RB92579 de cana-de-açúcar provenientes da Estação Experimental de Camaratuba, localizada na BR 101, próximo à entrada do município de Mataraca-PB, apresentando sintomas de perfuração e podridão foram utilizados para obtenção dos isolados de fitopatógenos. 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 (Figura 1). 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-água (BDA), acrescido de Tetraciclina 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.

Figura 1 – Seleção de fragmentos das margens de lesões em colmos de cana-de-açúcar



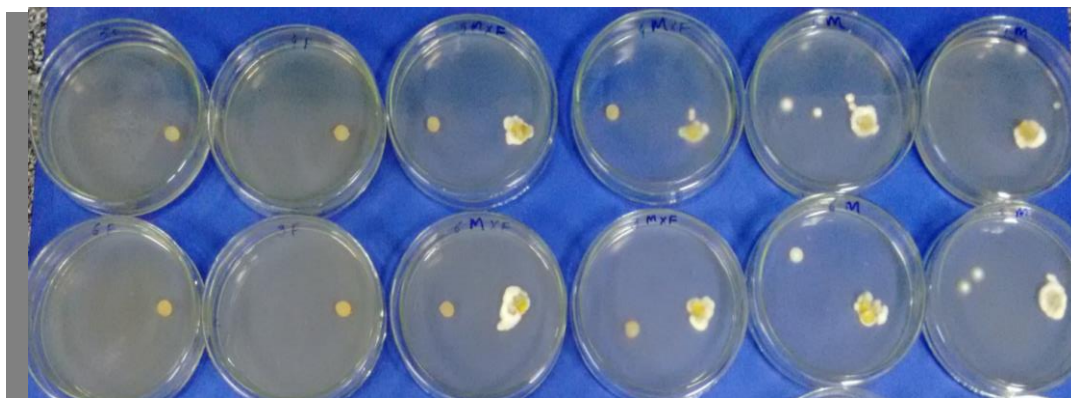
Fonte: Autor

3.4 Teste de antagonismo “in vitro” de *Metarhizium anisopliae* contra *Fusarium* spp

Os ensaios da capacidade antagônica de *Metarhizium anisopliae* ao patógeno *Fusarium* spp. previamente identificado no isolamento foram realizados através do cultivo pareado dos microrganismos “in vitro” em placas de Petri de 90 x 15 mm (Figura 2).

Em cada placa de Petri contendo meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de antibiótico (Tetraciclina) 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 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, (Figura 2) seguindo a metodologia de Siqueira (2016).

Figura 2 – Método da Confrontação direta (Bell et al., 1982, Adaptado por Siqueira (2016)



Fonte: Autor

Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em B.O.D. (26°C) por mais 11 dias para a observação do antagonismo (Figura 5). 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 equação: $PIC (\%) = [(crescimento \text{ do controle positivo} - crescimento \text{ do tratamento}) \times 100] / Crescimento \text{ do controle positivo}$. Uma avaliação categórica para o antagonismo foi feita utilizando a escala descrita por Bell et al., (1982) com adaptações (SIQUEIRA, 2016):

Tabela 1- Tipo de controle ou antagonismo por categoria. Adaptada de Bell (1982)

Categoria	Controle/Antagonismo
Categoria A	Sem nenhum controle, o fungo fitopatogênico cresce por cima do <i>M. anisopliae</i> (0);
Categoria B	O fungo fitopatogênico cresce até o limite da colônia de <i>M. anisopliae</i> , 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 <i>M. anisopliae</i> (+/-);
Categoria E	Total controle, o fungo <i>M. anisopliae</i> cresce por cima do fitopatógeno (X).

3.5 Análise Estatística

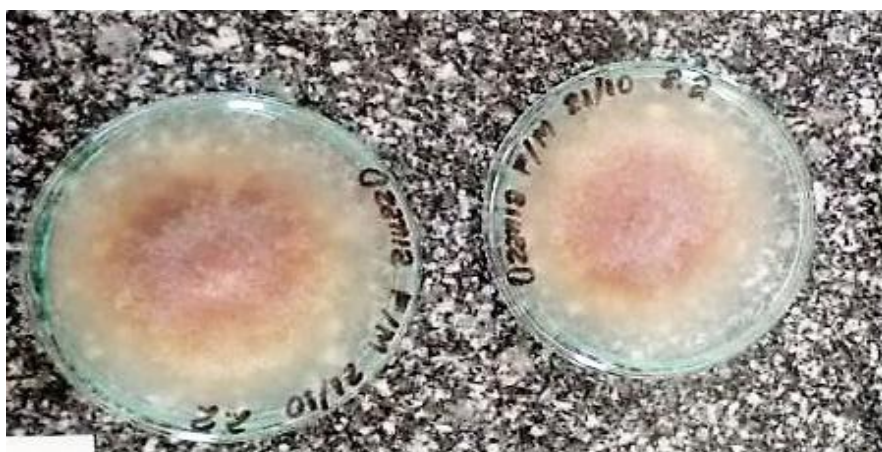
O delineamento utilizado foi constituído de três tratamentos e seis repetições, sendo os tratamentos distribuídos da seguinte forma: 1: *Metarhizium anisopliae* pareado com *Fusarium* spp. (T1); 2 *Metarhizium anisopliae* (T2); 3: *Fusarium* (T3). Os dados provenientes das áreas médias das colônias de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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Através da técnica de isolamento indireto e análise das características morfológicas o agente causador da podridão foi identificado como pertencente ao gênero *Fusarium* spp. O isolado obtido apresentou crescimento rápido e coloração róseo a púrpura (Figura 03). Em aspectos gerais, o 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).

Figura 3 – Placas de Petri contendo crescimento micelial de *Fusarium* spp.



Fonte: Autor

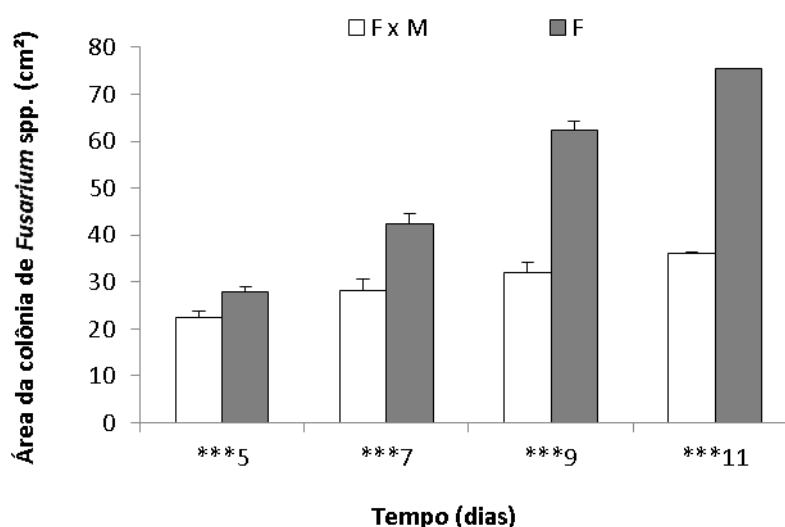
Patógenos como *Fusarium* são classificados como necrotróficos, ou seja, destroem os tecidos vegetais por meio da ação de toxinas ou enzimas que promovem a lise e morte da célula hospedeira, permitindo o acesso a nutrientes e o crescimento do patógeno (AGRIOS, 2005). Geralmente tais patógenos têm capacidade 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).

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

Foi verificada uma redução significativa do diâmetro do patógeno *Fusarium* spp. na presença do fungo de biocontrole *Metarhizium anisopliae*, já a partir do 5º dia de amostragem (Figura 4).

Figura 4 – Efeito antagônico do *Metarhizium anisopliae* contra o *Fusarium* sp. (FxM em branco) e o seu respectivo controle (F em cinza). Teste T: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



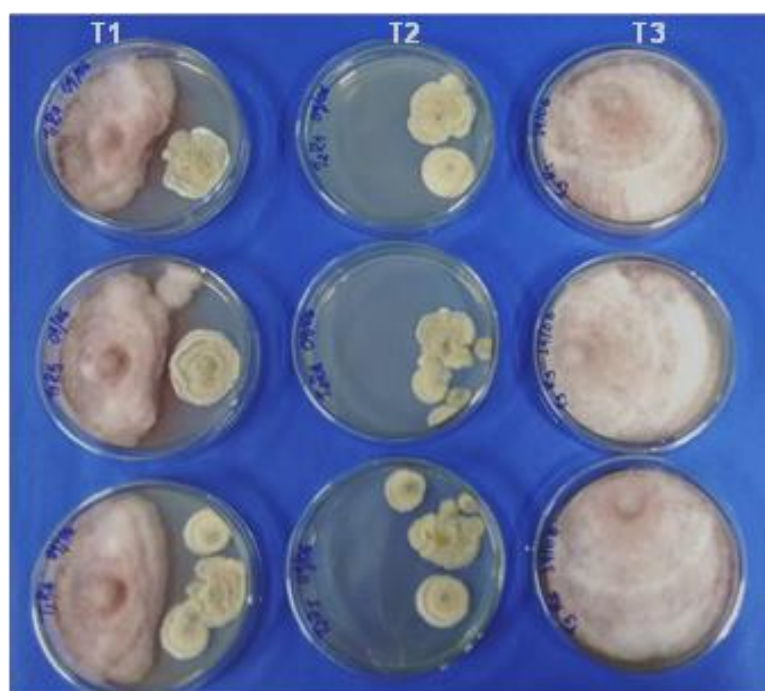
O estudo da capacidade antagônica de espécies de *Metarhizium* a fitopatógenos é recente e vem demonstrando resultados promissores. Um estudo realizado com *Metarhizium robertsii* e o fitopatógeno, *Fusarium solani*, causador da podridão da raiz de feijão demonstrou a formação de uma pequena zona de 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 que a melhor espécie foi *M. robertsii*, proporcionou até 54% de inibição para ambos os 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 fitopatógeno *Fusarium* spp. 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 (Figura 5). 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*.

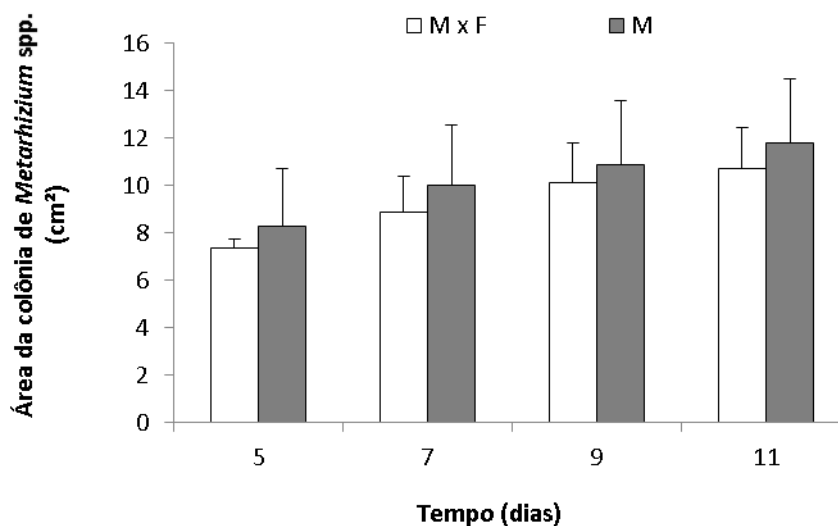
Figura 5 – Antagonismo “in vitro” de *Metarhizium anisopliae* pareado com *Fusarium* spp. (T1); *Metarhizium anisopliae* (T2) e *Fusarium* (T3).



Fonte: Autor

Não foi verificada diferença significativa do diâmetro do fungo biocontrole *Metarhizium anisopliae* na presença e ausência do patógeno *Fusarium* sp. (Figura 6), demonstrando que de fato houve a inibição ao fitopatógeno testado.

Figura 6 – Crescimento da colônia de *Metarhizium* sp. na presença (FxM em branco) e ausência de *Fusarium* sp. (F em cinza).



Os resultados obtidos nesta pesquisa representam o segundo relato de antagonismo de *Metarhizium anisopliae* a fitopatógeno, 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.

5 CONCLUSÃO

O isolado de *Metarhizium anisopliae* inibiu “in vitro” o crescimento micelial de *Fusarium* spp., patógeno causador de podridão em cana-de-açúcar.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudos futuros avaliando o efeito “in vivo” de *Metarhizium anisopliae* sobre *Fusarium* spp. em cana-de-açúcar no campo;
- Avaliação da melhor forma de aplicação nos colmos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A PRODUÇÃO de cana-de-açúcar no Brasil (e no mundo). NOVACANA.COM. [2009?]. Disponível em: < <https://www.novacana.com/cana-de-acucar/producao-cana-de-acucar-brasil-e-mundo/#producao-pelo-mundo>>. Acesso em: 27 jul. 2017.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G, **Métodos em Fitopatologia**, Viçosa, UFV, 2007, p.382
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414p.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5ª ed. San Diego: Elsevier, 2005, p.948.
- 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 | ABRIL 2017.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Boletim da safra de cana-de-açúcar 2017/18 Disponível em:<<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> Acesso em 23 mai. 2018
- 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.
- GALLO, D. et al. Entomologia agrícola. 3. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- 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.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI, F.O.E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 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.

MATSUOKA, S. Manejo de doenças e medidas de controle. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. (Eds.). **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016. cap. 5, p. 108-138

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Cana-de-açúcar. Brasília, maio 2018. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 20 mai. 2018

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.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas, Jaguariúna: Embrapa Meio ambiente, 2009, 341 p.

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.

NOCELLI, R C F.; ZAMBON, V.; SILVA, O. G. M. da; MORINI, M. S. de C. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil: contribuições e importância econômica. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Org.). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru, SP: Ed. Canal 6, 2017. Cap. 1, p. 13-30.

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.

SANGUINO, A. As principais doenças da cana-de-açúcar: Curso Tópico da Cultura de Cana IAC. ASAS – Álvaro Sanguino Assessoria, Planejamento e Consultoria Ltda, Piracicaba, SP. [2009?]. Disponível em: <http://www.infobibos.com/cursocana/alunos/aulas/Aula9/Aula_9.pdf>. Acesso em: 03 out. 2017.

SANTIAGO, A. D.; ROSSETTO, R. Doenças da cana-de-açúcar, (2017?). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html#>. Acesso em: 24 de maio de 2018.

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.

USINAS PARAIBANAS começam safra 2017/2018 e Asplan prepara fiscais para acompanhar a moagem. Associação dos Plantadores de Cana da Paraíba – ASPLAN, 2017. Disponível em: < <http://asplanpb.com.br/2017/07/27/usinas-paraibanas-comecam-safra-20172018-e-asplan-prepara-fiscais-para-acompanhar-moagem/>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

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.

WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S.; O que é Doença? In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. Fitopatologia, Conceitos e Exercícios de Laboratório, Porto Alegre, Artmed 2010, v.2, p. 25-28.

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