

Caracterização molecular, morfológica e funcional de um isolado peruano de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Bonifácio Magalhães ¹
Myrian Tigano ¹
Irene Martins ²
Heloisa Frazão ³
Gómez Ramirez ⁴

Introdução

Surtos de gafanhotos têm ocorrido na América do Sul por muitas décadas. O combate a essa praga tem sido feito através de aplicações maciças de inseticidas químicos, sendo que, nos últimos anos, o produto mais utilizado no mundo foi o fenitrotion, seguido de malation. Fenitrotion é um composto organofosforado de moderada toxicidade para mamíferos; é pouco persistente no meio ambiente (meia vida < 3 dias), mas apresenta alta toxicidade a artrópodes aquáticos e terrestres não-alvos (Prior & Streett 1997). Como resultado do efeito combinado entre alto custo de aplicação, danos ao ambiente e envenenamento de pessoas, tem havido um aumento significativo nas tentativas de substituir os inseticidas químicos por métodos alternativos de controle.

O controle dessa praga é, via de regra, subsidiado pelo governo. No Brasil, por exemplo, na década de 80, o Estado gastou entre 1 e 2 milhões de dólares na aplicação de inseticidas químicos em cada situação de emergência relacionada a surtos ocorridos nos estados de Mato Grosso e Rondônia. Nestes valores não estão computados

os custos relacionados às perdas econômicas de agricultores, aquelas decorrentes do impacto ambiental dos inseticidas em recursos hídricos, reservas indígenas, biodiversidade, entre outros. (Magalhães et al. 2000a).

No Peru, os gafanhotos migratórios *Schistocerca piceifrons piceifrons* e *S. interrita* são sérias pragas agrícolas desde 1901 (Beingolea-Guerreiro 1995). O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* foi encontrado no Peru (Cajamarca) infectando *S. interrita* no ano de 2000 (H. Gómez Ramirez, não publicado). Esse patógeno foi também encontrado no Nordeste brasileiro infectando *S. pallens* (Moreira et al. 1996) e tem sido desenvolvido com um micoinseticida contra gafanhotos em diversos países incluindo Brasil (Magalhães et al. 2000b, Magalhães et al. 2001), África (Lomer 1997) e Austrália (Milner 1997). Neste estudo identificamos e caracterizamos o isolado peruano de *M. anisopliae* var. *acridum*.

¹ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga, Técnica TSN I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Técnica TSN I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ SENASA, Lima, Peru.

Material e Métodos

O isolado peruano de *M. anisopliae* var. *acidum* está depositado sob o código CG 863 na Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. A identificação e caracterização foram feitas por comparação com dois outros isolados de *M. anisopliae* var. *acidum*, do Brasil (CG 423) e Austrália (FI 985), e com um isolado de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, obtido de outro Orthoptera (FI 1029). Os parâmetros usados foram tamanho de conídios, crescimento a 25 e 37°C, padrões de RAPD (Aljanabi & Martinez 1997, Sambrook et al. 1989, Tigano-Milani et al. 1995), e virulência contra o gafanhoto do Mato Grosso, *Rhammatocerus shistocercoides* (Magalhães et al. 1997).

Resultados

Os conídios do isolado peruano (CG 863) são muito similares aos conídios do isolado brasileiro (CG 423) de *M. anisopliae* var. *acidum*. Esses isolados produzem conídios ovóides medindo cerca de 5 x 2.7 µm (Fig. 1). Entretanto, os conídios do isolado australiano (FI 985) são quase cilíndricos e significativamente maiores do que os isolados brasileiro e peruano ($P < 0.1$). Estas observações estão de acordo com a descrição de Driver et al. (2000) para a variedade *acidum* de *M. anisopliae*.

Os três isolados de *M. anisopliae* var. *acidum* (CG 863, CG 423, FI 985) apresentaram padrão de crescimento similar em placas de ágar a 25 e 37°C (Tabela 1). Por outro lado, *M. anisopliae* var. *anisopliae* (FI 1029) apresentou um crescimento significativamente maior ($P < 0,114$) que o dos isolados de *M. anisopliae* var. *acidum* a 25°C e não cresceu a 37°C. Esta habilidade pouco comum apresentada por *M. anisopliae* var. *acidum* de crescer a 37°C já foi relatada anteriormente por Driver *et al.* (2000).

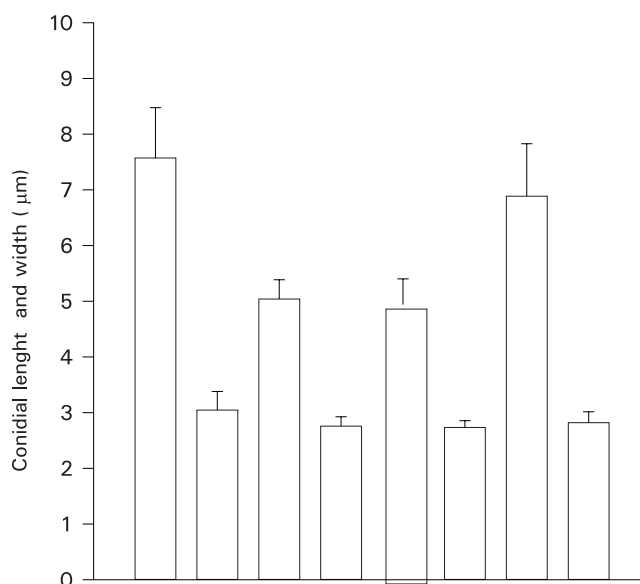


Fig. 1. Comprimento (C) e largura (L) de conídios dos quatro isolados de *M. anisopliae* estudados. Médias (\pm SD) de 50 medidas. Colunas seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Na análise de RAPD, com o uso de três primers, os isolados de *M. anisopliae* var. *acidum* apresentaram padrões similares (Fig. 4) muito distintos dos padrões de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Fig. 2).

Bioensaios preliminares indicaram que o isolado peruano é tão virulento contra *R. schistocercoides* quanto o isolado brasileiro (Fig. 3). Resultados semelhantes foram observados por Magalhães et al. (1997) quando o isolado CG 423 foi comparado ao isolado FI 985.

Concluindo, os isolados peruano e brasileiro de *M. anisopliae* var. *acidum* são muito próximos em termos de biologia, morfologia (tamanho de conídios) e padrões de RAPD. A existência de um isolado peruano nativo de *M. anisopliae* var. *acidum* muito próximo do isolado brasileiro reforça a idéia de desenvolver um micoinseticida baseado num único isolado contra gafanhotos-praga para a América

Tabela 1. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (FI 985, CG 423, CG 863) e *M. anisopliae* var. *anisopliae* (FI 1029) em meio sólido (SDAY) a 25 e 37°C.

Isolado	Diâmetro da colônia (mm) ¹			
	25°C		37°C	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
FI 985	17.0 \pm 0.0a	36.3 \pm 2.5a	11.0 \pm 0.0a	17.0 \pm 0.5a
CG 423	18.5 \pm 1.7a	35.5 \pm 0.6a	9.0 \pm 0.0b	10.7 \pm 0.0b
CG 863	18.0 \pm 0.0a	35.3 \pm 0.9a	9.0 \pm 0.0b	10.0 \pm 0.0b
FI 1029	30.0 \pm 0.0b	62.5 \pm 1.0b	0.0	0.0

⁽¹⁾ Médias (4 repetições) seguidas pela mesma letra nas colunas não são significativamente diferentes ($P < 0,114$).

⁽²⁾ Crescimento total a partir de um papel filtro circular de 6 mm de diâmetro embebido de uma suspensão de conídios.

do Sul. Isto é particularmente atrativo se considerarmos a necessidade de abaixar o custo e aumentar o mercado desses produtos.

Referências Bibliográficas

Aljanabi S.M.; Martinez, I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res.*, 25: 4692-4693, 1997.

Beingolea-Guerreiro, O. Langostas y su control. Ed. RAAA / SENASA. Lima, Peru. 143p.1995.

Driver, F., R.J. Milner, & J.W.H. Trueman. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104, 134-150. 2000.

Lomer C.J., C. Prior, & C. Koyman. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 171, 265-286.

Magalhães, B.P., M.R. Faria, M.S. Tigano & B.W.S. Sobral. Characterization and virulence of a Brazilian isolate of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171, 313-321. 1997.

Magalhães, B.P., M.R. Faria, & J.B.T. Silva. Controle microbiano de gafanhotos. In: Controle Biológico (Melo, I.S. & Azevedo, J.L. eds) Embrapa Meio Ambiente, 2000. pp. 173-211. 388p. 2000a.

Magalhães, B.P., M. Lecoq, M.R. Faria, F.G.V. Schmidt, & W.D. Guerra. Field trial with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* against bands of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Biocontrol Science and Technology* 10, 427-441. 2000b.

Magalhães, B.P., M.R. Faria, M. Lecoq, F.G.V. Schmidt,

J.B.T.S. Silva, & H.S. Frazão. The use of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Journal of Orthoptera Research* 10: 43-46. 2001.

Milner R.J. *Metarhizium flavoviride* (F1985) as a promising mycoinsecticide for Australian acridids. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 171, 287-300.1997.

Moreira, M.A., B.P. Magalhães, M.C.C. Valadares. & MC.M. Chagas. Occurrence of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brazil. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25, 359-361. 1996.

Prior, C.; D.A. Streett. Strategies for the use of entomopathogens in the control of the desert locust and other acridoid pests. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, v.171, p.5-25. 1997.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989. 120p.

Tigano-Milani, M.S.; Honeycutt, R.J.; Lacey, L.A.; Assis, R.; McClelland, M.; Sobral, B.W.S. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *J. Invertebr. Pathol.*, 65: 274-282, 1995.

Comunicado Técnico, 77

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Miraci de Arruda Câmara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva