

EFEITO DA TEMPERATURA, TEMPO DE ARMAZENAGEM E DO TIPO DE PREPARO, SOBRE O PODER GERMINATIVO DE ESPOROS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROKIN, CULTIVADO EM ARROZ

B.P. Bastos Cruz**, O.C. Abreu**, P.J. Valarini***, D.A. Oliveira****

RESUMO

O estudo foi efetuado com o objetivo de determinar a viabilidade de esporos de *Metarhizium anisopliae*, cultivado em meio de cultura de arroz, obtidos por três técnicas diferentes de preparo e armazenados sob três temperaturas distintas. Os tipos de preparo do fungo foram: "arroz + esporos" (matéria-prima), "arroz + esporos" moído e "esporos". As temperaturas usadas para armazenamento foram: ambiente (variável entre 26°C e 30°C), 5°C e -13°C. As determinações do poder germinativo dos conídios foram feitas em 8 amostras com diferentes períodos de secagem (umidade), que, em seguida, foram estocadas por 2 a 8 meses nas condições de temperatura referidas. O estudo obedeceu critérios estatísticos definidos. Entre as informações obtidas no trabalho, salienta-se o fato de que, sob condições de refrigeração, a viabilidade dos conídios na formulação "arroz + esporos" permaneceu constante durante todo o transcorrer do ensaio, o que não aconteceu para "arroz + esporos" moído e para "esporos". Constatou-se, ainda, que dentro dos tratamentos "arroz + esporos" e "esporos", a viabilidade dos conídios foi idêntica, a 5°C e -13°C. Em condições de ambiente houve rápida deterioração das amostras. Complementarmente, foi observado que a manipulação do microrganismo, ocasionada pelas operações de moagem e peneiragem, determinou quedas na viabilidade dos esporos. Contaminações constituídas pela presença dos fungos *Penicillium* spp. e *Aspergillus flavus* foram paralisadas pela armazenagem a 5°C e -13°C, mas afetaram seriamente as amostras estocadas em ambiente comum de laboratório. Tempo de secagem do fungo e teor de umidade das amostras foram também estudados, sem que fosse possível esclarecer devidamente os efeitos.

PALAVRAS-CHAVE: *Metarhizium anisopliae*; umidade; temperatura; armazenagem; tipo de preparo; viabilidade.

SUMMARY

Effect of temperature, storage period and preparation on spore viability of Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin, cultured in rice.

Studies were made to investigate viability of *Metarhizium anisopliae* spores obtained through three different techniques of preparation and stored under three temperature conditions. The preparations were as follows: mixture of rice and spores, mixture of ground rice and spores and pure spores. Storage temperatures were as follows: room temperature (variable), 5°C and -13°C. Determination of spores viability was made on 8 samples which had been dried at different periods of time (humidity) and stored for 2 to 8 months at the temperatures above. Spore viability in mixture of rice and spores at cool temperatures (5°C and -13°C) was constant during the period of the assay. In these temperature conditions loss of spores viability was observed in mixture of ground rice and spores and also in pure spores preparation. It was also observed that conidia viability in the mixture of rice and spore treatment and pure spore treatment was the same at 5°C and -13°C. At room temperature rapid deterioration of the samples was observed. Handling the microorganism as to grind and sift increased viability loss. Storage at 5°C and -13°C caused the growth of contaminant fungi (*Aspergillus flavus* and *Penicillium* spp.) to stop. These fungi seriously affected the samples at room temperature. As concerns drying time and moisture of the samples, it was not possible to obtain a valid estimate of the results, due to some uncontrolled factors.

KEY-WORDS: *Metarhizium anisopliae*; humidity; temperature; storage; techniques of preparations; viability.

* Projeto subvencionado pelo Convênio EMBRAPA/SAA/IB.

** Pesquisador Científico, Seção de Controle Biológico das Pragas, Instituto Biológico.

*** Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), trabalhando no Instituto Biológico.

**** Pesquisador Científico, Seção de Bioestatística, Instituto Biológico.

INTRODUÇÃO — Entre os fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* é o mais referido no Brasil, face à sua crescente utilização em pastagens e na cultura da cana-de-açúcar, com o objetivo de controle biológico de diferentes espécies de cigarrinhas (2, 5, 13, 14, 15, 17). Devido à expectativa favorável criada com vistas ao uso desse fungo, tanto em termos da sua possível eficiência para combater a praga, como também pelo fato de que com a sua utilização se lança mão de um princípio não-tóxico e não-poluente, o interesse dos pesquisadores em relação ao mesmo vem sendo marcado pela divulgação de sucessivos resultados de estudos feitos sob os mais diversos prismas.

Com vistas ao preparo de *M. anisopliae*, encontra-se atualmente consagrada a técnica de seu cultivo em substrato sólido, constituído por arroz inteiro, úmido, autoclavado (3, 9, 10). Sabe-se, entretanto, que o rendimento na produção de esporos do fungo em meio de cultura à base de quirera de milho é também elevado, embora inferior ao obtido em arroz (8). Recentemente, em estudos usando substratos naturais líquidos, foram também observados altos níveis de esporulação do fungo cultivado em caldo à base de feijão de mesa, do cultivar Carioca (11). Ainda em relação ao preparo do *Metarhizium anisopliae*, deve ser dada ênfase à substituição da vidraria, tradicionalmente usada para acondicionamento do arroz nos laboratórios de produção, por sacos de polipropileno, já devidamente aprovados em trabalho de pesquisa (4).

A utilização prática do *Metarhizium anisopliae* também tem sido fruto de estudos e a recomendação técnica do seu uso vem sendo feita com base em resultados de experimentos em diversas regiões do Brasil, nas quais a presença de cigarrinhas é tida como fator limitante para pastagens e cana-de-açúcar. Nesses experimentos de campo, a eficiência do fungo, bem como os níveis recomendáveis para a concentração de seus esporos, vêm sendo largamente estudados (12, 16, 18, 19, 20, 21).

O armazenamento de *M. anisopliae* tem-se constituído, também, em um tema preocupante para pesquisadores, produtores do fungo e usuários das diversas formulações comerciais existentes. Em regra, recomenda-se que o produto seja conservado em geladeira (4°C-5°C) até a sua aplicação no campo. Resultados pouco satisfatórios, observados algumas vezes na prática, são associados à estocagem inadequada, principalmente no que diz respeito às condições de temperatura e umidade. Sabe-se, hoje, que esporos de *M. anisopliae* degradam-se com rapidez (2 a 3 meses), quando conservados em meio am-

biente. Em geladeira, a 5°C, o processo degenerativo é mais lento, mas, após serem guardados por 6 a 8 meses, o poder germinativo desses esporos chega a valores muito baixos (menos de 20%). Pela manutenção em congelador, a -13°C, observam-se níveis de 60% de germinação em esporos estocados durante 12 meses (11).

No presente trabalho, são relatadas pesquisas sobre a viabilidade de esporos de *Metarhizium anisopliae* obtidos sob diversas condições de preparo, buscando-se, dessa forma, complementar informações anteriores, quando foram feitos estudos usando esporos puros. No desenvolvimento deste trabalho, foram também levados em conta os teores de umidade dos esporos do fungo, durante o período de secagem e diferentes temperaturas de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS — O estudo foi iniciado em 10/11/82, com o preparo do substrato de cultura destinado ao cultivo do *M. anisopliae*. Foram empregadas 60 garrafas de vidro, com volume de 500ml, contendo, cada uma, 65g de arroz umedecido, autoclavado por 30 minutos à pressão de 120 libras/polegada². Esses frascos foram inoculados em 11/11/82, usando-se, para cada um deles, 20ml de uma suspensão de esporos em água destilada estéril, da cepa E9 fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Os frascos foram então levados para uma sala de incubação, cuja temperatura variou entre 27 e 29°C, onde permaneceram por 13 dias.

Em 24/11/82, os frascos foram abertos, e seu conteúdo retirado e colocado para secar sobre folhas de papel estéril mantidas em uma sala previamente desinfetada com uma solução de formol em água a 4%. A temperatura da sala de secagem foi mantida entre 26 e 27°C. Esporos coletados na ocasião apresentavam porcentagem de germinação de 97,6% e teor de umidade da ordem de 48,53%.

Dois dias após, foi feita a primeira retirada de amostra para exame, que era constituída por 310g do material em secagem. Essa amostra foi subdividida em 3 porções de 100g e uma de 10g. As 3 primeiras foram acondicionadas em recipientes de vidro, fechados, com tampas rosqueáveis de plástico e, a seguir, foram estocadas em congelador à temperatura de -13°C. A amostra de 10g foi enviada à Seção de Química do Instituto Biológico, para determinação do grau de umidade. A seguir, em obediência aos mesmos critérios de coleta e acondicionamento, foram retiradas mais nove amostras de 310g, aos 5, 7, 9, 12, 15, 19, 23, 26 e 33 dias do início do processo de secagem. A última coleta ocorreu em 27/12/82.

Em 12/01/83, após 16 dias, todo o material estocado a -13°C foi retirado do congelador, sendo as 3 amostras de 100g, colhidas de cada vez, tratadas da seguinte forma: uma foi triturada em um moedor de carne, sendo o resíduo passado por uma peneira Granutest com malha de 0,35mm, obtendo-se, como produto final, uma mistura de arroz + esporos de *M. anisopliae*, moída; outra foi passada diretamente pela mesma peneira, o que possibilitou separar os esporos do fungo dos grãos de arroz (só esporos); e a última foi conservada na forma original de arroz + esporos. Todo o material foi recolocado no congelador. Em 12/04/83, decorridos 3 meses, cada uma das amostras de 100g, representativa de cada retirada, foi subdividida em 3 porções, que após acondicionadas em frascos plásticos fechados com tampas também de plástico e rosqueáveis, foram estocadas: em geladeira, a 5°C ; a -13°C , em congelador; e em ambiente de laboratório, com variações de temperatura de 26 a 30°C .

Pelo fato de que as amostras colhidas aos 7 e 9 dias de secagem apresentavam teores de umidade muito próximos, elas foram misturadas, constituindo uma amostra única. O mesmo ocorreu com as amostras de 12 e 15 dias. Nos dois casos, foi tomada a média dos valores percentuais determinados pela Seção de Química como dado representativo da nova amostra. As modificações introduzidas fizeram com que o número de opções relativas aos dias de secagem ficasse reduzido de 10 para 8.

Nas datas de 15/06, 18/07, 10/08, 13/09, 12/10 e 12/12/83, ou seja, após 2, 3, 4, 5, 6 e 8 meses de armazenamento, as amostras constituídas pelos 3 diferentes tipos de preparo do fungo, submetidas a 3 diferentes condições de temperatura de armazenagem, foram examinadas para a determinação das percentagens de germinação dos esporos. Para isso, inicialmente, 5mg de cada amostra foram passadas para um frasco contendo 10ml de uma solução de Tween-80 em água estéril, na concentração de 0,1%. Após agitar os frascos para homogeneizar a suspensão de esporos, 0,1ml da mesma era colocado em placa de Petri contendo meio de cultura Batata-Ágar-Dextrose (BDA) e espalhado sobre a superfície desse meio com o auxílio de uma espátula de Drigalski. Após 16-17 horas de incubação a 27°C , determinou-se a germinação dos esporos em microscópio, usando magnificação de 400 x.

Com o objetivo de facilitar a visualização do complexo de atividades executadas no preparo do material submetido aos testes de germinação de esporos, as características desse pre-

paro estão sumariadas na tabela 1.

TABELA 1 — Resumo das atividades desenvolvidas no decorrer do estudo feito com vistas à determinação do efeito do complexo: "teor de umidade/temperatura e tempo de armazenamento/tipo de preparo do fungo", sobre o poder germinativo dos conídios de *Metarhizium anisopliae*.

Atividades	Épocas	Dias após secagem	Umidade %
Inoculação	11/11/82	—	—
Amostra 1 (início da secagem)	24/11/82	—	48,53
Amostra 2	26/11/82	2	35,72
Amostra 3	29/11/82	5	24,06
Amostra 4*	01/12/82	7	10,23
Amostra 5*	03/12/82	9	9,18
Amostra 4/5	—	—	9,70
Amostra 6*	06/12/82	12	6,38
Amostra 7*	09/12/82	15	6,37
Amostra 6/7	—	—	6,37
Amostra 8	13/12/82	19	3,69
Amostra 9	17/12/82	23	7,25
Amostra 10	20/12/82	26	8,20
Amostra 11	27/12/82	33	5,21
Preparo final do fungo	12/01/83	—	—
Separação e acondicionamento para ensaio	12/04/83	—	—
1ª Leitura germinação	15/06/83	—	—
2ª Leitura germinação	18/07/83	—	—
3ª Leitura germinação	10/08/83	—	—
4ª Leitura germinação	13/09/83	—	—
5ª Leitura germinação	12/10/83	—	—
6ª Leitura germinação	12/12/83	—	—

* Amostras misturadas (4+5 = 4/5 e 6+7 = 6/7).

A análise dos dados obtidos no ensaio foi feita com o apoio no seguinte modelo estatístico matemático:

$$\hat{Y}_{ijkl} = m + s_i + p_j + r_k + t_l + sp_{ij} + sr_{ik} + st_{il} + pr_{jk} + pt_{jl} + rt_{kl} + e_{ijkl} \dots \dots \dots \text{Modelo 1.}$$

Neste modelo, os componentes correspondem:

s = tempo de secagem: i = 1, 2, ..., 8;
 p = tempo de armazenamento: j = 1, 2, ..., 6;
 r = tipo de material: k = 1, 2;
 t = temperatura de armazenagem: e = 1, 2.

Levou-se em conta que, tanto para o tempo de armazenamento como para o de secagem, os efeitos são de caráter aleatório, enquanto que, para o tipo de material e temperatura de armazenagem, têm-se efeitos fixos; as interações duplas também são aleatórias e as interações triplas e quádruplas, pela ausência de repetições, constituem o resíduo.

O modelo estatístico adotado não atendeu a todas as possibilidades existentes no planeja-

mento da pesquisa, que previa uma variação a mais para cada um dos dois fatores de efeito fixo, ou seja: em tipo de material, excluiu-se a alternativa "arroz + esporos" moído e, em temperatura de armazenagem, a temperatura ambiente foi eliminada. As justificativas de tal procedimento encontram-se no item Resultados. Por outro lado, o modelo permitiu a análise dos dados por fases. Assim sendo, em uma primeira etapa, definida como análise inicial, as interações foram consideradas de modo preponderante, para, em seguida, serem levados em conta os efeitos principais.

Conforme se verificará na discussão, o desenvolvimento da análise levou à utilização, em fase posterior, de novo modelo estatístico-matemático (6, 7), a saber:

$$\hat{Y}_{ijk} = m + s_i + t_j + P_k + tp_{jk} + e_{ijk} \dots \text{Modelo 2.}$$

onde:

s = amostras confundidas com repetições:

i = 1, 2, 3, 4;

t = tratamentos: j = 1, 2, 3, 4.

1 - esporos a -13°C;

2 - (arroz + esporos) a -13°C;

3 - esporos a 5°C;

4 - (arroz + esporos) a 5°C.

p = meses: k = 1, 2, 3, 4.

1 - Junho;

2 - Julho;

3 - Agosto;

4 - Setembro.

Os testes F, realizados nas duas análises, efetuados com os dados originais, obedeceram às exigências das esperanças matemáticas dos quadrados médios e os modelos estatísticos-matemáticos propostos. Os graus de liberdade, para os efeitos principais, foram calculados pela fórmula de Satterthwaiti. Os contrastes de médias das amostras foram feitos com base no teste de Tukey; para contraste entre coeficientes angulares, fez-se uso do teste t; a correlação entre a umidade e o tempo de secagem, bem como todas as demais avaliações, foram testadas ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS – Os percentuais de germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae*, obtidos e estocados conforme a metodologia já descrita, encontram-se nas tabelas 2, 3 e 4.

Na tabela 5, estão reunidos os valores coletados nas tabelas 3 e 4, que foram efetivamente utilizados nas análises.

O resumo da análise inicial, realizada conforme o modelo estabelecido, é apresentado na tabela 6.

Levando-se em consideração a análise inicial em conjunto, pôde-se, em virtude da significância observada para os efeitos principais, determinar as médias para os diferentes fatores, as quais são apresentadas na tabela 7. Com base nos valores constantes dessa tabela, e tendo em vista a aplicação do Modelo 2, foi efetuada a análise complementar, que é apresentada na tabela 8, e cujas médias para tratamento e para períodos de armazenamento estão na tabela 9.

TABELA 2 — Percentuais de germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* obtidos sob 3 diferentes métodos de preparo e submetidos a 8 variações de tempo de secagem, quando conservados em condições de laboratório.

Características		Percentagens de germinação					
		Datas de leitura					
		15/06	18/07	10/08	13/09	12/10	12/12
Nº Amostra	Material						
2	E	88,48	0	0	0	—	—
	A+E	0	0	0	0	—	—
	(A+E)m	—	—	0	—	—	—
3	E	55,27	69,26	30,50	38,31	0	0
	A+E	82,49	75,41	58,15	11,82	5,88	0
	(A+E)m	—	10,25	0	—	—	—
4/5	E	0	0	0	0	—	—
	A+E	0	0	0,13	0	—	—
	(A+E)m	—	0	—	—	—	—
6/7	E	0	0	0	0	—	—
	A+E	0	0	0	0	—	—
	(A+E)m	—	0	0	—	—	—
8	E	0	0	0	0	—	—
	A+E	0	0	0	0	—	—
	(A+E)m	—	0	0	—	—	—
9	E	0	0	0	0	—	—
	A+E	0	0	0	0	—	—
	(A+E)m	—	0	0	—	—	—
10	E	0	0	0	0	—	—
	A+E	0	0	0	0	—	—
	(A+E)m	—	0	0	—	—	—
11	E	0	0	0	0	—	—
	A+E	0	0	0	0	—	—
	(A+E)m	—	0	0	—	—	—

E = esporos; A+E = arroz + esporos; (A+E)m = (arroz + esporos) moído; — = leitura prejudicada por contaminações.

TABELA 3 — Percentuais de germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* obtidos sob 3 diferentes métodos de preparo e submetidos a 8 variações de tempo de secagem, quando conservados à temperatura de 5°C.

Características		Percentagens de germinação					
		Datas de leitura					
		15/06	18/07	10/08	13/09	12/10	12/12
2	E	68,96	57,62	56,38	57,34	0,78	2,12
	A+E	93,98	21,29	77,59	77,42	0	0,15
	(A+E)m	34,78	31,66	24,86	14,06	0,46	0,66
3	E	77,70	66,73	52,37	56,49	32,40	45,16
	A+E	86,22	90,96	90,79	90,34	91,06	82,80
	(A+E)m	18,90	48,66	10,79	9,83	0,85	8,61
4/5	E	87,68	82,42	78,15	63,25	5,90	10,22
	A+E	95,91	92,91	94,21	95,68	71,86	75,00
	(A+E)m	13,15	36,58	3,75	3,06	0	0
6/7	E	86,77	83,20	63,76	64,24	5,75	11,15
	A+E	77,76	76,60	75,66	76,15	78,90	84,41
	(A+E)m	0	0	0	—	0	0
8	E	77,13	74,54	58,76	57,24	58,94	32,45
	A+E	86,80	87,15	81,94	81,88	81,23	19,21
	(A+E)m	7,50	0	0	—	—	2,94
9	E	77,51	70,31	45,46	45,26	20,43	17,88
	A+E	76,89	65,96	53,45	54,45	7,33	5,58
	(A+E)m	0	0	0	—	—	0
10	E	53,59	68,12	38,74	38,56	21,84	27,30
	A+E	72,41	58,92	44,25	47,83	16,20	27,99
	(A+E)m	0	0,44	0,54	—	—	0
11	E	66,58	61,41	43,61	41,13	33,44	25,83
	A+E	89,34	82,26	48,44	45,96	32,87	37,74
	(A+E)m	0	0	0	—	—	0

E = esporos; A+E = arroz + esporos; (A+E)m = (arroz + esporos) moído; — = leitura prejudicada por contaminações.

TABELA 4 — Percentuais de germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* obtidos sob 3 diferentes métodos de preparo e submetidos a 8 variações de tempo de secagem, quando conservados à temperatura de -13°C.

Características		Percentagens de germinação					
		Datas de leitura					
		15/06	18/07	10/08	13/09	12/10	12/12
Nº Amostra	Material						
2	E	84,68	84,08	81,87	81,83	56,34	54,74
	A+E	94,18	93,40	93,83	75,56	70,15	43,24
	(A+E)m	0	81,14	65,00	40,25	7,53	12,96
3	E	95,18	94,52	84,79	76,72	53,23	56,00
	A+E	87,02	88,01	83,85	81,98	69,66	70,02
	(A+E)m	29,78	54,11	51,74	24,56	6,89	8,16
4/5	E	82,71	81,79	81,58	76,80	59,41	60,84
	A+E	92,09	93,42	91,08	88,47	87,56	81,00
	(A+E)m	22,47	62,06	—	6,47	3,28	4,49
6/7	E	91,37	84,40	71,94	48,15	48,80	46,57
	A+E	95,35	93,12	93,69	91,97	90,69	89,28
	(A+E)m	26,15	31,03	—	3,38	1,00	3,65
8	E	93,42	82,92	76,15	68,05	66,49	59,33
	A+E	92,02	90,93	90,82	84,72	85,91	87,84
	(A+E)m	8,69	11,76	1,01	1,23	0,54	0,56
9	E	72,18	72,77	73,50	37,97	21,76	26,77
	A+E	92,01	91,75	20,58	71,95	29,23	36,00
	(A+E)m	1,17	0	4,77	0,99	0	0
10	E	86,75	84,42	80,94	21,49	12,50	15,70
	A+E	78,11	77,69	77,73	55,39	47,58	50,00
	(A+E)m	1,95	12,72	—	0,49	1,27	1,28
11	E	79,53	78,57	69,50	41,03	25,81	28,84
	A+E	93,25	90,90	87,22	86,09	80,90	73,75
	(A+E)m	3,06	6,81	1,66	0	0,54	0

E = esporos; A+E = arroz + esporos; (A+E)m = (arroz + esporos) moído; — = leitura prejudicada por contaminações.

TABELA 5 – Valores coletados nas tabelas 3 e 4 e que foram reunidos para apoio das análises efetuadas para interpretação estatística dos dados obtidos no estudo do efeito do complexo: “teor de umidade/temperatura e tempo de armazenamento/tipo de preparo do fungo”, sobre o poder germinativo de conídios de *Metarhizium anisopliae*.

Características			Percentagens de germinação					
			Datas de leitura					
Nº Amostra	Temp.	Material	15/06	18/07	10/08	13/09	12/10	12/12
2	-13°C	E	84,7	84,1	81,9	81,8	56,3	54,7
		A+E	94,2	93,4	93,8	75,6	70,1	43,2
	5°C	E	69,0	57,6	56,4	57,3	0,7	2,1
3	-13°C	E	94,0	91,3	77,6	77,4	0,0	0,1
		A+E	95,2	94,5	84,8	76,7	53,2	56,0
	5°C	E	87,0	88,0	83,8	82,0	69,8	70,0
4/5	-13°C	E	77,7	66,7	52,4	56,5	32,4	45,2
		A+E	86,0	91,0	90,8	90,3	91,0	82,8
	5°C	E	82,7	81,8	81,6	76,8	59,4	60,8
6/7	-13°C	E	92,1	93,4	91,1	88,5	87,6	81,0
		A+E	87,7	82,4	78,1	63,2	5,9	10,2
	5°C	E	95,9	92,9	94,2	95,7	71,9	75,0
8	-13°C	E	91,4	84,4	71,9	48,1	48,8	46,6
		A+E	95,3	93,1	93,7	92,0	90,7	89,3
	5°C	E	86,8	83,2	63,8	64,2	5,7	11,1
9	-13°C	E	77,8	76,6	75,7	76,1	78,9	84,4
		A+E	93,4	82,9	76,1	68,0	66,9	59,3
	5°C	E	92,0	90,9	90,8	84,7	85,9	87,8
10	-13°C	E	77,1	74,5	58,8	57,2	58,9	32,4
		A+E	86,8	87,1	81,9	81,9	81,2	19,2
	5°C	E	72,2	72,8	73,5	38,0	21,8	26,8
11	-13°C	E	92,0	91,7	90,6	71,9	29,2	36,0
		A+E	77,5	70,3	45,5	45,3	20,4	17,9
	5°C	E	76,9	66,0	53,4	54,4	7,3	5,6
12	-13°C	E	86,7	84,4	80,9	21,5	12,5	15,7
		A+E	78,1	77,7	77,7	55,4	47,6	50,0
	5°C	E	53,6	68,1	38,7	38,6	21,8	27,3
13	-13°C	E	72,4	58,9	44,2	47,8	16,2	28,0
		A+E	79,5	78,6	69,5	41,0	25,8	28,8
	5°C	E	93,2	90,9	87,2	86,1	80,9	77,7
14	-13°C	E	66,6	61,4	43,6	41,1	33,4	25,8
		A+E	89,3	82,3	48,4	46,0	32,9	37,7

Temp. = temperatura; E = esporos; A+E = arroz + esporos.

TABELA 6 – Resumo da análise inicial destinada à interpretação estatística dos dados obtidos no estudo do efeito do complexo: “teor de umidade/temperatura e tempo de armazenamento/tipo de preparo do fungo”, sobre o poder germinativo de conídios de *Metarhizium anisopliae*.

F.V.	G.L.	F
Total	191	
Temperatura armazenagem	1	16,06*
Tipo material	1	16,90*
Tempo armazenamento	5	8,52*
Tempo de secagem	7	3,71*
Temp. armazen. x tipo material	1	0,03n.s.
Temp. armazen. x tempo armazenamento	5	2,93*
Temp. armazen. x tempo secagem	7	1,43n.s.
Tipo material x tempo armazen.	5	2,88*
Tipo material x tipo secagem	7	1,99n.s.
Tempo armazen. x tempo secagem	35	1,55*
Resíduo	117	
m = 54,7	s = 12,6	C.V. = 19,3%

* = efeito significativo, ao nível de 5%.

TABELA 7 – Médias obtidas para temperatura de armazenagem, tipo de material, tempo de armazenamento e tempo de secagem, relativas às porcentagens de germinação dos esporos de *Metarhizium anisopliae*.

Fator	Especificação	Média ⁽¹⁾
Temperatura armazenagem		
	geladeira (5°C)	57,8 a
	“freezer” (-13°C)	72,9 b
Tipo material		
	esporos	57,1 a
	arroz + esporos	73,0 b
Tempo armazenamento ⁽²⁾		
	Junho (2 meses)	83,9 c
	Julho (3 meses)	81,0 c
	Agosto (4 meses)	72,9 bc
	Setembro (5 meses)	65,0 b
	Outubro (6 meses)	45,8 a
	Dezembro (8 meses)	43,8 a
Tempo secagem ⁽³⁾		
Amostra 2	2 dias	62,4 a
Amostra 3	5 dias	75,2 b
Amostra 4/5	7 a 9 dias	76,2 b
Amostra 6/7	12 a 15 dias	72,1 b
Amostra 8	19 dias	74,0 b
Amostra 9	23 dias	52,4 a
Amostra 10	26 dias	50,2 a
Amostra 11	33 dias	60,3 a

(1): Médias seguidas de letras iguais são semelhantes (considerar por fator).

(2): d.m.s. para tempo de armazenamento: 13,8

(3): d.m.s. para tempo de secagem: 15,1

A significância dos contrastes para os dois primeiros fatores foram definidos pelo teste F e, para os demais, pelo teste de Tukey.

TABELA 8 – Resumo da análise complementar, baseada no Modelo 2, e que permite isolar-se de fatores principais, interações, e definir-se as linhas de regressão para tempo de armazenamento do poder germinativo de *Metarhizium anisopliae*.

F.V.	G.L.	F
Total	63	
Repetição ⁽¹⁾	3	3,06*
Tratamentos	3	9,58*
Meses	3	4,46*
Tratamentos x Meses	9	2,30*
Meses/Tratamentos		
Esporos	3	9,06*
Regressão Linear (R.L.)	1	26,27*
Desvios da R.L.	2	0,46n.s.
Arroz + Esporos	3	0,43n.s.
Esporos	3	9,76*
Regressão Linear (R.L.)	1	27,97*
Desvios da R.L.	2	0,81n.s.
Arroz + Esporos	3	0,03n.s.
Resíduo	45	
m = 81,9	s = 6,3	C.V. = 7,6%

(1) = repetições confundidas com amostra.

TABELA 9 — Médias obtidas para tratamentos e para períodos de armazenamento, relativas ao poder germinativo de *Metarhizium anisopliae*, tendo por base o Modelo 2*.

Tratamentos	Meses			
	Junho	Julho	Agosto	Setembro
-13°C				
Esporos	90,7 a B	85,9 ab B	76,8 b AB	67,4 a A
Arroz + Esporos	91,6 a —	91,3 b —	89,9 b —	86,8 b —
5°C				
Esporos	82,3 a B	76,7 a B	63,3 a A	60,3 a A
Arroz + Esporos	86,6 a —	86,9 ab —	85,6 b —	86,0 b —

* As letras minúsculas são relativas à comparação de tratamentos dentro de meses; devem, pois, ser observadas na vertical.

As letras maiúsculas são relativas à comparação de meses dentro de tratamentos; devem, pois, ser observadas na horizontal. Neste caso, só se aplica aos tratamentos "esporos", -13°C e 5°C.

Os contrastes de médias foram definidos pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO — Inicialmente, deve-se considerar que os percentuais de germinação de esporos das amostras armazenadas no ambiente não foram incluídos na análise global, junto àqueles obtidos a 5°C e -13°C. Tal fato se deveu, com exceção de poucos casos, ocorridos na amostra n.º 3, à quase total ausência de germinação de esporos e também, principalmente, nas leituras finais, à proliferação de fungos contaminantes de laboratório (*Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp.), que prejudicaram os testes de viabilidade.

Convém lembrar que, em 15/06/83, data da primeira leitura, o fungo aproximava-se dos 7 meses de produção (início da secagem), embora se encontrasse há apenas 2 meses devidamente acondicionado. Houve, portanto, rápida queda na capacidade de germinação dos esporos conservados no meio ambiente, queda que chegou a zero (Tab. 2) para a quase totalidade dos casos, já a partir da primeira leitura. Essa queda de viabilidade dos esporos não-refrigerados foi mais severa do que a observada anteriormente (1), quando zero foi constatado somente aos 120 dias de armazenagem.

Quanto aos dois microrganismos contaminantes, detectados, às vezes, desde a leitura inicial, foram, certamente, incorporados às amostras na operação de secagem, sendo seu desenvolvimento acelerado em função de temperatu-

ra ambiente, teor de umidade das amostras e aumento do tempo de armazenagem. Nas duas leituras finais, as amostras apresentavam-se inteiramente contaminadas, com uma única exceção para a n.º 3, o que confirma a necessidade de adoção de maiores cuidados com a assepsia, para a produção de fungo absolutamente puro.

Também o material constituído por "arroz + esporos" moído, tanto a 5°C como a -13°C, foi eliminado da análise global, devido às diferenças marcantes entre os percentuais de germinação de conídios neste tipo de preparo do fungo, e naqueles encontrados em "esporos" e "arroz + esporos" (Tab. 3 e 4). Os baixos níveis de germinação em "arroz + esporos" moído são uma consequência da operação de moagem, quando a excessiva manipulação da matéria-prima e o aquecimento do moinho acarretaram prejuízos aos esporos.

Desta forma, a análise estatística foi realizada com vistas aos dados obtidos para os seguintes fatores: a) tempo de armazenagem; b) tempo de secagem; c) temperatura (5°C e -13°C); d) tipos de material: "esporos" e "arroz + esporos".

A análise inicial (Tab. 6), realizada com base no Modelo 1, demonstrou que só há interações significativas quando um dos fatores envolvidos é o tempo de armazenagem. Foi verificado, também, que os efeitos para temperatura de armazenagem, tipo de material, tempo de armazenagem e tempo de secagem foram significativos. Deve ser ressaltado que o coeficiente de variação (C.V. = 19,3%) foi considerado alto para as condições do trabalho, o que justificou a necessidade de que se procedesse a uma avaliação mais detida dos resultados, com o objetivo de identificar quais os fatores que provocaram tal variabilidade, e em que níveis. Daí a determinação das médias, conforme o apresentado na tabela 7.

Com base nas médias relacionadas na tabela 7, verificou-se que, quando considerados os fatores tempo de armazenagem e tempo de secagem, era possível a divisão dos tratamentos em dois grupos para cada um desses fatores. Assim é que, para o tempo de armazenagem, há um grupo superior constituído pelas leituras de junho/julho/agosto/setembro de 1983, quando o poder germinativo esteve acima de 50%, e as estimativas foram semelhantes; e um grupo inferior, incluindo as leituras de outubro/dezembro de 1983. Para o tempo de secagem, o grupo superior englobou as amostras: 3, 4-5, 6-7 e 8, com poder germinativo acima de 70%, enquanto que o grupo inferior, formado pelas amostras 2, 9, 10 e 11, teve poder germinativo variando entre 50,2% e 62,4%.

Estes resultados possibilitaram a adoção de

uma linha subsequente de trabalho, em que foram escolhidos para estudo os dois grupos superiores descritos e, também, os fatores: temperatura de armazenagem e tipo do material. Esta nova linha levou à aplicação do Modelo 2 de análise.

Com base neste Modelo, foi efetuada a análise complementar, cujo resumo é apresentado na tabela 8, a qual mostrou que tanto a interação como os efeitos principais são significativos.

Em virtude da interação ser significativa, foi feito o desdobramento do efeito dos meses dentro de cada um dos tratamentos, constatando-se (Tab. 9) que, para "arroz + esporos", independente da temperatura, não há modificação no poder germinativo; enquanto que, para "esporos", também independente da temperatura, o teste F foi significativo. Foi constatada regressão linear significativa para o poder germinativo, quer a -13°C , quer a 5°C . Diante dos desvios das regressões lineares não-significativas, verificou-se, pelos coeficientes de determinação, a excelência das regressões: $R_1^2 = 96,6\%$ e $R_3^2 = 94,5\%$, respectivamente, para -13°C e 5°C . O coeficiente de variação de apenas 7,6%, observado na análise complementar da tabela 8, evidencia que o material trabalhado foi, desta vez, mais homogêneo.

De outra parte, quando examinadas as médias contidas na tabela 9, verificou-se que quando se consideram os tratamentos, em cada um dos meses, embora até julho/1983 haja semelhança nas respostas, em setembro/1983 esses tratamentos já se dividiram em grupos; sendo um grupo com médias menores, com os tratamentos "esporos", tanto a -13°C como a 5°C , e um grupo com médias maiores, com os tratamentos "arroz + esporos", em ambas as temperaturas. Se, por outro ângulo, observam-se os meses, em cada um dos tratamentos, verifica-se que, para "esporos", houve uma redução do poder germinativo com o passar do tempo, para as duas temperaturas. Estas reduções, que já haviam sido caracterizadas pela existência das regressões lineares, são apoiadas nos seguintes coeficientes angulares: $b_{-13^{\circ}\text{C}} = -7,7125$ e $b_{5^{\circ}\text{C}} = -7,9575$, os quais, através do teste t, verificou-se serem semelhantes ($t = 0,12$ n.s.). As linhas de regressão que se obtêm são paralelas, o que possibilitou um coeficiente angular médio: $\bar{b} = -7,8350$. Por outro lado, como as médias foram semelhantes (Tab. 9), com exclusão do mês de agosto, pôde-se estabelecer apenas uma linha de regressão, a qual, com $R^2 = 98,6\%$, é a seguinte: $\hat{Y}_k = 95,2275 - 7,8350 P_k$.

A semelhança entre o poder germinativo em qualquer mês e em qualquer temperatura,

para o tratamento "arroz + esporos", está também caracterizada na tabela 9; sendo conveniente definir, apenas, um valor, que é a média geral para as diferentes situações (88,1).

Com relação aos intervalos de confiança, tanto para a linha de regressão "esporos" como para a média geral "arroz + esporos" os valores obtidos conduziram ao preparo da figura 1.

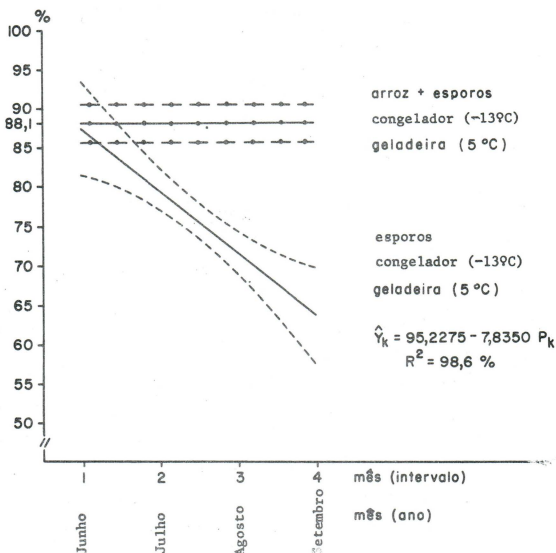


FIGURA 1 - Viabilidade de esporos de *M. anisopliae* frente ao tempo de armazenamento e aos meses utilizados. Estimativas médias para as temperaturas -13°C e 5°C .

Quando se analisou o conjunto de dados, através do Modelo 1, válido para o período de junho a dezembro, chegou-se, entre outras, à conclusão de que as médias para "arroz + esporos" foram quase sempre superiores às médias para "esporos", conforme se observa na tabela 9. Por outro lado, através das interações (Tab. 8), verificou-se ser conveniente estudar em separado os diferentes fatores. Assim, procedeu-se através da análise segundo o Modelo 2, válido para o período junho a setembro e seus desdobramentos. Com este Modelo, as interações entre o tempo de armazenamento e os tratamentos definiram a necessidade de fazer a decomposição do tempo de armazenamento dentro de meses. Desta forma, constatou-se que o tratamento "arroz + esporos" era caracterizado por um valor médio semelhante para os diferentes meses, enquanto que, para o tratamento "esporos", havia redução para menor no valor das médias, de mês para mês.

Face a tais procedimentos, pode-se considerar que o tratamento "arroz + esporos" deve se manter por todo o período, junho a dezembro,

com média maior. Esta possibilidade é plenamente viável em virtude da eliminação de efeitos não relativos ao tratamento "arroz + esporos" pelo Modelo 2.

Foi ainda constatado, pela observação conjunta das tabelas 5, 7 e 9, eliminando-se considerações com a amostra 2, que as médias de germinação para "arroz + esporos" são altas, mantendo-se no intervalo de confiança estimado e caracterizado na figura 1. Esta figura define a queda, inclusive com intervalos de confiança, que ocorre com a viabilidade dos esporos, nos tratamentos em que o arroz não está presente.

A análise efetuada com o objetivo de estabelecer o efeito das temperaturas de armazenagem não acusou superioridade na germinação dos esporos estocados a -13°C , em relação a 5°C . Esta resposta está em desacordo com resultados anteriormente descritos, para armazenagem de esporos puros de *Metarhizium anisopliae* (1), quando a temperatura de -13°C foi mais efetiva para preservação da viabilidade dos conídios. Esta diferença de comportamento pode ser, provavelmente, atribuída ao elevado nível de umidade da amostra de esporos de *Metarhizium anisopliae* usada no trabalho citado e que levou à "degradação das amostras caracterizada por alterações na coloração do pó, pela formação de aglomerados de esporos que se uniram devido à condensação da umidade natural, do produto e pelo cheiro fétido", características que foram notadas com frequência no fungo mantido à temperatura ambiente.

No presente caso, o efeito similar das duas temperaturas mostrou-se extensivo ao fungo preparado sob a forma de "arroz + esporos". Aliás, com vistas aos tipos de material em estudo, a viabilidade dos conídios em "arroz + esporos" sobrepujou estatisticamente a constatada na formulação "esporos".

Para os resultados relacionados com o tempo de armazenamento, houve a confirmação de trabalho anterior (1), pois foi constatado que o poder germinativo do tratamento "esporos" decaiu à medida que aumentou o tempo de armazenagem, possivelmente em consequência do fato de que para a obtenção dos esporos faz-se a retirada do substrato de arroz.

O estudo procurando correlacionar os fatores tempo de secagem e umidade das amostras não ofereceu resultado estatístico significativo, sendo plausível a sua repetição, no futuro.

Finalmente, há que considerar o fato de que, no armazenamento a 5°C e a -13°C , poucos foram os casos em que a leitura foi prejudicada em virtude do desenvolvimento de conta-

minações, ou seja, 9 e 3 ocorrências, respectivamente, contra 62 amostras mantidas normais em condições de laboratório. Estes valores numéricos evidenciam a exigência da manutenção do *Metarhizium anisopliae* a baixas temperaturas, como recurso para paralisar o desenvolvimento das contaminações que muitas vezes ocorrem no processo de preparo do fungo.

CONCLUSÕES – Ficaram evidentes, no estudo, os seguintes conceitos sobre o comportamento do fungo:

a) A viabilidade dos esporos de *M. anisopliae* esteve constante durante todo o período do trabalho (novembro/82 a dezembro/83), quando o fungo foi mantido sob refrigeração em substrato de arroz;

b) As temperaturas de -13°C e 5°C atuaram de forma idêntica no que diz respeito ao comportamento dos materiais armazenados;

c) O poder germinativo dos esporos é visivelmente influenciado, em caráter negativo, pelo aumento de manipulação, o que implica em que a viabilidade dos esporos é alterada em função do tipo de preparo do fungo;

d) Contaminações ocorridas durante o processo de produção do *Metarhizium anisopliae*, pela manifestação dos fungos *Penicillium* spp. e *Aspergillus flavus*, dominaram amostras mantidas no meio ambiente, mas foram quase que totalmente paralisadas em seu desenvolvimento, quando mantidas a 5°C e a -13°C . Em razão desse fato, os testes de viabilidade para essas amostras decorreram normalmente, tendo as mesmas, em geral, apresentado bom aspecto.

Além disso, foram confirmadas as seguintes informações obtidas anteriormente:

A) O fungo *Metarhizium anisopliae* não deve ser estocado em ambiente não-refrigerado;

B) O poder germinativo dos conídios de *M. anisopliae* decai à medida que aumenta o tempo de armazenamento, quando se estocam esporos puros.

AGRADECIMENTOS

Os autores consignam seu agradecimento ao Dr. J.R. Piedade (Chefe) e demais Pesquisadores Científicos da Seção de Química, da Divisão de Defensivos Agrícolas, pelas determinações de umidade feitas para as amostras de *Metarhizium anisopliae* estudadas, e aos Drs. Mário Barreto Figueiredo, Célia de Campos Lassa e Cybele P. Vaz Pimentel pela revisão do texto do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, O.; VALARINI, P.J.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em função do período e condições de armazenamento. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 50: 57-63, 1983.
2. AQUINO, M.L.N. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Bol. Téc. Inst. Agron.* (72): 1-26, 1974.
3. AQUINO, M.L.N.; CAVALCANTI, V.A.I.B.; SE-NA, R.C. de; QUEIROZ, G.F. de Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. *Bol. Téc. CODECAP*, Recife, (4): 1-79, 1975.
4. AQUINO, M.L.N.; VITAL, A.F.; CAVALCANTI, V.L.B.; NASCIMENTO, M.G. Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em sacos de polipropileno. *Bol. Téc. CODECAP*, Recife, (5): 1-11, 1977.
5. AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C.L. O papel dos fungos no controle dos insetos. *O Estado de São Paulo*. Suplemento Cultural, 3(132): 14-5, 1979.
6. BLISS, C.Z. *Statistics in biology*, New York, Mc Graw-Hill, 1970, v.2.
7. BROWNLEE, K.A. *Statistical theory and methodology in science and engineering*. New York, John Wiley, 1970. 570p.
8. CAMARGO, L.M.P. de C.A. Desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes meios de cultura naturais sólidos. *Biológico*, São Paulo, 49: 107-9, 1983.
9. COSTA, M.D.M. & CLÓVIS, D.M. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin parasito da cigarrinha das pastagens. *Bol. Inst. Biol. Bahia*, 13: 57-60, 1974.
10. COSTA, M.D.M.; MATTA, E.A.F.; MAGALHÃES, C.D.; MATOS, D.P. Nova técnica para produção em larga escala do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em laboratório. *Bol. Inst. Biol. Bahia*, 13: 85-9, 1974.
11. CRUZ, B.P.B.; ABREU, O.C.; OLIVEIRA, D.A.; CHIBA, S. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em meios de cultura naturais, líquidos. *Biológico*, São Paulo, 49: 111-6, 1983.
12. FERRAZ, M.C.D.V.; CORREIA, J.S.; MATTA, E.A.F. da; COSTA, J.A. Estudo da eficiência do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no controle da cigarrinha das pastagens. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 6., Campinas, 1980. *Resumos*.
13. GUAGLIUMI, P. As cigarrinhas das pastagens e seu controle biológico no Nordeste do Brasil. *Ruralidade*, Goiânia, 1(2): 33-7, 1970.
14. GUAGLIUMI, P. *As cigarrinhas dos canaviais* (Hom., Cercopidae) no Brasil. 8. Luta Integrada contra as "Cigarrinhas da Cana e das Pastagens" no Nordeste do Brasil. Recife, PE, Comissão de Combate à Cigarrinha, 1971. 43p. (Publicação n. 3)
15. GUAGLIUMI, P. *Pragas da cana de açúcar no Nordeste do Brasil*, 1972/73. Rio de Janeiro, Inst. do Açúcar e do Alcool, 1974. 622p. (Col. Canavieira, 10).
16. GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J.; VILAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da "cigarrinha da folha" *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil (1). *Bol. Téc. CODECAP*, Recife, (3): 1-57, 1974.
17. LEPAGE, H.S. & MONTE, O. As cigarrinhas do capim "Kikuo". *Biológico*, São Paulo, 8: 225-9, 1942.
18. MACEDO, N.; MENDES, A.C.; BOTELHO, P.S. M.; MAGRO, J.A. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarrinha da raiz (*Mahanarva fimbriolata* Stal.) na cultura de cana de açúcar. *Bras. Açucareiro*, 90(2): 16-9, 1977.
19. PACHECO, S.M. & BERNARDES, M.G. Ensaio de campo com fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em três concentrações de esporos, visando o controle da cigarrinha das pastagens, *Zulia entreriana* Berg., no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 3., Maceió, 1976. *Resumos*.
20. RAMIRO, Z.A. & COTTAS, M.P. Ensaio de campo com diferentes dosagens de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, visando o controle de *Deois flavopicta* (Stal. 1824) e *Zulia entreriana* (Berg. 1879) em pastagens. *Biológico*, São Paulo, 45: 199-204, 1979.
21. VEIGA, A.F.S.L.; AQUINO, M.L.N.; ARRUDA, G.P. Nota sobre o controle biológico das cigarrinhas das pastagens (Homoptera-Cercopidae) com fungo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Pesqui. Agropec. Nordeste*, Recife, 4(2): 71, 1972.

Recebido para publicação em 07/12/1984.