

Patogenicidade dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Isaria farinosa* em *Brassolis sophorae* (Lepidoptera: Nymphalidae)

Pathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Isaria farinosa* to *Brassolis sophorae* (Lepidoptera: Nymphalidae)

Fabiane CUNHA^{1,2}; Rogério Aparecido DEPIERI³; Ayres Oliveira MENEZES JR⁴; Pedro Manoel Oliveira Janeiro NEVES⁵; Talita Moretto ALEXANDRE⁶; Vânia Maria RAMOS⁷; Rafael Gervasoni Ferreira LEITE⁸; Viviane Tavares de ALMEIDA⁹

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor; Pesquisa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

² Autor para correspondência; Doutor; Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Departamento de Agronomia, Laboratório de entomologia agrícola. Rodovia Raposos Tavares, Km 572 – Bairro Limoeiro, Presidente Prudente-SP CEP 19067-175 fabiane@unoeste.br

³ Doutor, Embrapa Soja, radepieri@gmail.com

⁴ Doutor Universidade Estadual de Londrina, ayres@uel.br

⁵ Doutor Universidade Estadual de Londrina, pedroneves@uel.br

⁶ Doutor Universidade Estadual de Londrina, tma_@yahoo.com.br

⁷ Doutor Universidade do Oeste Paulista, vania@unoeste.br

⁸ Mestrando, Universidade do Oeste Paulista, rafaelgervasoni@yahoo.com.br

⁹ Mestranda, Universidade do Oeste Paulista, vivianetavaresdealmeida@gmail.com

Recebido em: 08-05-2013; Aceito em: 20-03-2014

Resumo

A lagarta-das-folhas-do-coqueiro (*Brassolis sophorae*) (Lepidoptera: Nymphalidae) é uma das principais pragas desta cultura, causando severos danos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dois fungos entomopatogênicos no controle de *B. sophorae*. Suspensões de esporos em diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* (UEL50) e *Isaria farinosa* URM5026) foram pulverizadas sobre as lagartas, de 3^a instar, acondicionadas em caixas de acrílico e deixadas a 26 °C, com fotofase de 12 horas. Os dois isolados confirmaram mortalidade de *B. sophorae*, sendo que o isolado de *M. anisopliae* nas concentrações de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ esporos mL⁻¹ causou mortalidades de 12,5 ± 2,50%, 28,8 ± 5,49% e 42,5 ± 5,26%, respectivamente, e *I. farinosa*, nas concentrações de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ esporos mL⁻¹, causou mortalidade de 48 ± 2,45%, 84 ± 4,00% e 94 ± 2,45%, respectivamente. Este isolado tem possibilidades de ser mais bem investigado para futuras contribuições em programas de manejo da cococultura.

Palavras-chave adicionais: *Cocos nucifera*; controle biológico; controle microbiano; fungos entomopatogênicos.

Abstract

The coconut leaf caterpillar, *Brassolis sophorae* (Lepidoptera: Nymphalidae), is one of the major pests in this crop causing severe losses when control measures are not used. This work had the objective of evaluating two entomopathogenic fungi to control the insect. Different concentrations of spore suspensions of *Metarhizium anisopliae* (UEL50) and *Isaria farinosa* (URM5026) were sprayed over third-instar larvae in acrylic boxes and maintained at 26 °C and photophase of 12 h. Two isolates confirmed mortality *B. sophorae*. The isolate *M. anisopliae* at concentrations 10⁶, 10⁷, and 10⁸ spores mL⁻¹, caused mortality 12.5 ± 2.5%, 28.8 ± 5.5%, and 42.5 ± 5.3% larval mortality, respectively. *Isaria farinosa* at 10⁶, 10⁷, and 10⁸ spores mL⁻¹ caused, respectively, mortality of 48.0 ± 2.45%, 84.0 ± 4.0%, and 94.0 ± 2.4%. This isolate is likely to be further investigated in future contributions to management programs of coconut growth.

Additional keywords: biological control; *Cocos nucifera*; entomopathogenic fungi; microbial control.

Introdução

A lagarta-das-folhas-do-coqueiro, *Brassolis sophorae* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), é uma das principais pragas das palmáceas de importância econômica e social como o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (LORDELLO 1949; RAI 1973). Essas lagartas possuem hábito gregário e constroem seus abrigos unindo vários folíolos onde permanecem inativas até o crepúsculo, saindo dos mesmos durante a noite, quando se alimentam. Por vezes, as lagartas constroem seus abrigos em volta da coroa foliar, recobrendo as bainhas das folhas e parte dos cachos (GALLO et al., 2002). Os surtos dessa lagarta causam drástica redução na área foliar, e consequente atraso no desenvolvimento da planta (FERREIRA et al., 1998; GALLO et al., 2002). O ataque das lagartas nas palmeiras adultas pode causar a queda dos frutos e impedir a produção por, pelo menos, dois anos (MOURA, 1989).

Atualmente, existe o inseticida químico (Lufenurum) e o produto biológico *Bacillus thuringiensis* registrados para controle de *B. sophorae* em dendezeiro ou outras palmáceas (MAPA, 2013). Devido às poucas alternativas de controle da lagarta-das-folhas-do-coqueiro, existe a necessidade de se investigar novos métodos e agentes, principalmente com baixo impacto ambiental, entre eles, os fungos entomopatogênicos. A utilização dos fungos e sua capacidade de transmissão horizontal na população, devido ao hábito de agregação das lagartas, podem facilitar o controle, aumentando sua eficiência.

A ocorrência natural de fungos entomopatogênicos em *B. sophorae* é citada por Alves et al. (1994). Estes autores observaram epizootias causadas por *Isaria farinosa* no Estado de São Paulo, mostrando o potencial deste fungo no controle deste inseto. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a patogenicidade e a virulência de isolados de fungos das espécies *M. anisopliae* e *I. farinosa* em *B. sophorae*, visando a selecionar a espécie mais virulenta para futuras investigações de seleção de isolados.

Material e métodos

Os bioensaios foram realizados no laboratório de Controle Microbiano de Insetos (LCM), da Universidade Estadual de Londrina, para avaliar a ação letal dos fungos *M. anisopliae* (UEL50) e *I. farinosa* (URM5026) pulverizados sobre lagartas de 3^o instar de *B. sophorae*; posteriormente, foram incubados em câmara climatizada tipo B.O.D a 25 ± 1 °C, 65 ± 5% de U.R. e fotofase de 12 h.

Obtenção dos entomopatógenos. Os isolados utilizados nos bioensaios foram obtidos da coleção de entomopatógenos do LCM. O isolado de *M. anisopliae* foi coletado de Hemíptero (Cydnidae), no Paraná, e o isolado *I. farinosa* foi obtido de lagartas de *B. sophorae* infectadas em área de cultivo de dendê, em Tailândia-PA. Os fungos foram multiplicados em meio batata-dextrose-ágar, onde permaneceram até o 11^o dia.

Viabilidade dos conídios. Antes da realização dos bioensaios, foi avaliada a germinação dos conídios das diferentes espécies. Somente foram utilizados conídios que tiveram acima de 80% de viabilidade.

Obtenção das lagartas. Lagartas de *B. sophorae* foram coletadas em área de cultivo de coco, no Câmpus de Arenito – Centro de Pesquisas de Cidade Gaúcha-PR, da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Em laboratório, as lagartas foram mantidas em potes plásticos fechados (20 cm de altura x 9 cm de diâmetro) e alimentadas com folíolos de coqueiro, *ad libitum*, durante seis dias, para a observação de emergência de parasitoides ou sintomas de doenças. Após esse período, lagartas de aproximadamente 3,0 cm de *B. sophorae* foram acondicionadas em potes plásticos (5 cm de altura x 8,5 cm de diâmetro), em grupos de 10 indivíduos, para a pulverização de suspensões aquosas de conídios dos entomopatógenos.

Pulverização dos conídios sobre as lagartas. Os conídios foram raspados da superfície do meio de cultura (BDA), acondicionados separadamente em tubos de ensaio e suspensos em água destilada, esterilizada com Tween[®] 20 (0,02%). Em seguida, os tubos foram vigorosamente agitados em vórtex, para a separação dos conídios e, posteriormente, quantificadas as suspensões em câmara de Neubauer. Após a quantificação, a suspensão de conídios de *I. farinosa* foi diluída para as concentrações de 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ conídios/mL, e a suspensão de conídios de *M. anisopliae* foi diluída nas mesmas concentrações, com exceção de 10³ conídios/mL.

Estabelecimento dos bioensaios. Para o isolado de *I. farinosa*, foram utilizadas 50 lagartas, sendo separadas, em cinco repetições com 10 lagartas cada. Para cada repetição, foi realizada a pulverização dos conídios em uma suspensão de 4 mL, utilizando torre de Potter regulada à pressão de 15 lb pol⁻². No tratamento-testemunha, a mesma quantidade de lagartas foi pulverizada com o mesmo volume de água destilada estéril com Tween[®] 20 (0,02%). As lagartas tratadas com conídios de *I. farinosa* foram transferidas, em grupos de 10 indivíduos, para o interior de

recipientes plásticos anteriormente descritos, contendo folíolos cortados de coqueiro. Já no bioensaio, utilizando lagartas tratadas com conídios de *M. anisopliae*, foram acondicionadas também em grupos de 10 indivíduos, porém com 8 repetições, e seguiu-se a mesma metodologia acima citada. A mortalidade das lagartas foi avaliada a cada três dias, durante 15 dias, sendo também limpos os recipientes, e o alimento renovado. Em ambos os bioensaios, a mortalidade causada pelos entomopatógenos foi confirmada com a transferência das lagartas para câmara úmida, permitindo o crescimento do micélio e a esporulação sobre o tegumento.

Análise estatística e estimativa de CL₅₀. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2001). Para *I. farinosa*, por ter causado níveis de mortalidade superiores a 80%, foi estimada a CL₅₀ por Probit (FINNEY, 1971), utilizando o programa XLStat 7.5.2., módulo XLStat-Dose 3.

Resultados e discussão

A lagarta-do-coqueiro foi suscetível para o isolado *M. anisopliae* (UEL50), nas concentrações de 1×10^6 a 1×10^8 conídios mL⁻¹, e a mortalidade confirmada pelo patógeno foi significativamente maior que o tratamento-testemunha; todavia, o efeito letal não chegou a atingir 50% das lagartas, mesmo na concentração mais elevada de conídios; por essa razão, não foi possível estimar a CL₅₀ desse isolado (Tabela 1).

Isaria farinosa (URM5026) foi o fungo mais virulento contra as lagartas *B. sophorae*, com mortalidade confirmada de até 94% dos indivíduos (1×10^8 conídios mL⁻¹), 15 dias após o tratamento. As concentrações de 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 conídios mL⁻¹ provocaram mortalidade confirmada, significativamente maior que o tratamento-testemunha (0%), e foram, respectivamente, de 48%, 84% e 94% (Tabela 1).

Ao avaliarmos a evolução da mortalidade ao longo do tempo, observamos que, principalmente para as três maiores dosagens, a mortalidade confirmada aumentou consideravelmente a partir do sexto dia após a inoculação, sendo maior e atingindo níveis mais elevados em função das maiores dosagens. Das três espécies de fungos testadas, somente para *I. farinosa* foi possível determinar a CL₅₀, que foi de $9,39 \times 10^5$ conídios mL⁻¹, variando de $5,38 \times 10^5$ a $1,67 \times 10^6$ conídios mL⁻¹ ($R^2 = 0,995$) (Tabela 2).

A maior capacidade infectiva desse isolado, em comparação ao isolado *M. anisopliae*, pode estar relacionada, em parte, por ele ter sido obtido de lagartas de *B. sophorae* mortas por esse agente etiológico. É possível que os isolados

provenientes do inseto-alvo sejam mais adaptados para infectar o inseto de onde foram isolados e, conseqüentemente, mais virulentos. Esse fato pode ser sustentado pelo relato de Alves et al. (1994), que observaram que é muito comum a ocorrência de epizootias causadas por *I. farinosa* em *B. sophorae*, no Estado de São Paulo.

A maior capacidade infectiva desse isolado, em comparação ao isolado *M. anisopliae*, pode estar relacionada, em parte, por ele ter sido obtido de lagartas de *B. sophorae* mortas por esse agente etiológico. É possível que os isolados provenientes do inseto-alvo sejam mais adaptados para infectar o inseto de onde foram isolados e, conseqüentemente, mais virulentos. Esse fato pode ser sustentado pelo relato de Alves et al. (1994), que observaram que é muito comum a ocorrência de epizootias causadas por *I. farinosa* em *B. sophorae*, no Estado de São Paulo.

Aspectos comportamentais também podem atuar de modo negativo ou positivo na velocidade de morte dos insetos. A agregação de indivíduos, um comportamento de defesa de *B. sophorae*, pode favorecer o desenvolvimento de doenças em populações de insetos, especialmente causadas por fungos entomopatogênicos, pela transmissão horizontal. As lagartas, permanecendo agregadas durante o dia em invólucros de seda nas folhas, podem favorecer a disseminação de entomopatógenos de indivíduos infectados para outros sadios, principalmente em condições favoráveis de umidade e de temperatura, e do constante contato entre insetos (ALVES & LECUONA, 1998). Este aspecto pode ser explorado no controle de *B. sophorae* através da aplicação diurna nos locais de agregação das lagartas, aumentando a eficiência de controle e diminuindo a quantidade de fungo a ser empregada, assim tornando-o mais competitivo econômica e ecologicamente. Apesar de esses resultados terem sido obtidos em laboratório, onde as condições são plenamente favoráveis ao desenvolvimento dos fungos, os mesmos são muito importantes, pois fornecem informações necessárias para a seleção adequada para as pesquisas de campo. Por outro lado, é oportuno mencionar que a mortalidade das lagartas de *B. sophorae* por *I. farinosa*, quando no campo, pode manter-se alta, pela elevada virulência desse fungo. Também, o fungo possibilita a interação com outros agentes de controle biológico, podendo ser inserido no manejo desta praga, bem como no manejo fitossanitário da cultura.

Estudos para a seleção de isolados para *B. sophorae* deverão utilizar, como padrão de comparação para a mortalidade, o isolado URM5026. Dando continuidade ao trabalho realizado, testes complementares poderão disponibilizar uma tecnologia de controle para essa praga.

Tabela 1 - Mortalidade confirmada (Média ± E.P.) de lagartas de *B. sophorae* pulverizadas com conídios de *Isaria farinosa* e *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$ para análise. *Confirmed mortality (Mean ± E.P) of larvae of B. sophorae dusted with conidia of Isaria farinosa and Metarhizium anisopliae at different concentrations. Transformed data for analysis.*

Concentração (conídios mL ⁻¹)	Mortalidade confirmada de lagartas de <i>B. sophorae</i> (%)	
	<i>Isaria farinosa</i> (n=5)	<i>Metarhizium anisopliae</i> (n=8)
0	0 a	0 a
1x10 ³	4 ± 6,00 a	-
1x10 ⁴	6 ± 11,66 a	0 ab
1x10 ⁵	16 ± 17,72 a	3,8 ± 1,83 ab
1x10 ⁶	48 ± 2,45 bc	12,5 ± 2,50 bc
1x10 ⁷	84 ± 4,00 cd	28,8 ± 5,49 cd
1x10 ⁸	94 ± 2,45 d	42,5 ± 5,26 d

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Concentração letal (CL₅₀) do isolado (URM5026) de *Isaria farinosa* após mortalidade confirmada de *Brassolis sophorae*. *Lethal concentration (LC50) of isolated (URM5026) Isaria farinosa mortality after confirmed Brassolis sophorae.*

Equação de regressão	CL ₅₀ intervalo (95%)	R ²	χ ²
Y = -4,5889 + 0,7683*Logx	9,39 x 10 ⁵ 5,38 x 10 ⁵ – 1,67 x 10 ⁶	0,995	6,122 ns.

[†] Número de insetos; ns - não significativo p<95% (ajusta-se ao modelo). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Conclusões

O isolado de maior capacidade infectiva em *Brassolis sophorae* foi o isolado *Isaria farinosa*.

Agradecimento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à Prof^a Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pela identificação do fungo *I.farinosa*. Ao Prof. Dr. Pedro Neves, pela cessão de amostra do isolado de *M. anisopliae*.

Referências

ALVES, S. B. VIEIRA, S. A.; BERTI FILHO, E. Occurrence of *Paecilomyces spp.* in Brazil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.69, p.113-115, 1994.

ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. p.97-169.

FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F.; SANTANA, D. L. Q.; MOURA, J. I. L. SOUZA, L. A. Pragas do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p.189-267.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd. London, Cambridge University Press, 1971.

GALLO, D.; NAKANO O.; NETO, S. S.; CARVALHO R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B., PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

LORDELLO, L. G. E. *Brassolis sophorae lurida* Stich, séria praga das palmáceas. **Sítios e Fazendas**, São Paulo, v.14, n.11, p.9-17, 1949.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. **Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS**. Disponível em : <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 13 nov. 2012.

MOURA, J. I. L. **Como combater a lagarta das folhas do coqueiro**. Ilhéus: CEPLAC-CPEC, 1989. 6p. Folder.

RAI, B.K. *Brassolis sophorae* and *Castnia daedalus*: chemical control of these major pests of coconut in Guyana. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, n.66, p.177-180, 1973.

SAS INSTITUTE. SAS/stat. **User's guide**, Version 8.02, TS level 2MO. 4th ed. Cary: SAS Institute, 2001. v.2.