

**EFEITO DOS ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF)
SOROKIN (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) SOBRE PARASITOIDE
Cotesia flavipes (CAMERON, 1891) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

HAYASHIDA, Eduardo Kenji¹
KASSAB, Samir Oliveira²
FONSECA, Paulo Rogério Beltramin da³
ROSSONI, Camila⁴
LOUREIRO, Elisângela de Souza⁵
AMORIM, Luis Gustavo Pessoa⁶

Recebido em: 2011-09-09

Aprovado em: 2012-04-13

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.650

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre o parasitoide larval *Cotesia flavipes*. O experimento foi conduzido à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h, empregando-se o delineamento inteiramente casualizado com 16 tratamentos e 5 repetições, com um total de 10 adultos de *C. flavipes* por repetição. Foram utilizados os seguintes tratamentos: Testemunha (não-tratada), isolados UFGD 05, IBCB 348 e IBCB 425 nas concentrações de 1.0×10^7 ; 0.5×10^8 ; 1.0×10^8 ; 0.5×10^9 e 1.0×10^9 conídios.mL⁻¹. Os insetos foram acondicionadas em tubos de plástico tipo Falcon®, contendo um pedaço de papel filtro inoculado com 1mL de suspensão fúngica e uma gota de mel. Os resultados demonstraram que os isolados UFGD 05, IBCB 348 e IBCB 425 apresentaram baixa virulência aos adultos do parasitóide *C. flavipes*.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Controle microbiano. Entomopatógenos.

SUMMARY: The objective of this study was to evaluate the effect of isolated *Metarhizium anisopliae* on larval parasitoid *Cotesia flavipes*. The experiment was conducted at a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, RH $70 \pm 10\%$ and 12h photophase, using a completely randomized design with 16 treatments and five repetitions, with a total of 10 adults *C. flavipes* by repetition. We used the following treatments: control (untreated), isolates UFGD 05, IBCB 348 and IBCB 425 at concentrations of 1.0×10^7 ; 0.5×10^8 ; 1.0×10^8 ; 0.5×10^9 e 1.0×10^9 conidia.mL⁻¹. The insects were placed in plastic tubes of type Falcon®, containing a piece of filter paper inoculated with 1 mL⁻¹ of fungal suspension and a gout of honey. The results showed that the isolates UFGD 05, IBCB 348 and IBCB 425 had low virulence to adult parasitoids *C. flavipes*.

Keywords: Sugar cane. Microbial control. Entomopathogens.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar representa um dos principais produtos agrícolas do Brasil, o plantio da cultura é expandido a cada ano e atualmente a área cultivada ocupa aproximadamente 8 milhões de hectares do território nacional (CONAB, 2011).

¹Biólogo, Mestrando em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, UFGD. Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Caixa Postal 533, Bairro Aeroporto, CEP: 79804-970, Dourados-MS, e-mail: ekhayashida@hotmail.com.

²Biólogo, Doutorando em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, UFGD. Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Caixa Postal 533, Bairro Aeroporto, CEP: 79804-970, Dourados-MS, e-mail: samirkassab@gmail.com.

³Engº Agrônomo, Doutorando em Agronomia (Produção Vegetal), Faculdade de Ciências Agrárias, UFGD. Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Caixa Postal 533, Bairro Aeroporto, CEP: 79804-970, Dourados-MS, e-mail: prbeltramin@hotmail.com.

⁴Bióloga, Mestranda em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, UFGD. Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Caixa Postal 533, Bairro Aeroporto, CEP: 79804-970, Dourados-MS, e-mail: camilarossoni15@hotmail.com;

⁵Engª, Agr. Drª, Professora Adjunto I. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Chapadão do Sul. Caixa Postal 112, CEP: 79560-000, Chapadão do Sul, MS, e-mail: elisangela.loureiro@ufms.br.

⁶Engº Agrônomo, Professor Adjunto I. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Chapadão do Sul. Caixa Postal 112, CEP: 79560-000, Chapadão do Sul, MS, e-mail: gugamorim@yahoo.com.br.

Apesar da sua importância a cultura da cana-de-açúcar pode sofrer injúrias de muitos insetos, tornando-se fator limitante a produção sucroalcooleira. Dentre as espécies pragas, a de maior importância é a *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), devido à ampla distribuição e dimensão dos prejuízos que causam (SILVA *et al.*, 2010).

As lagartas de *D. saccharalis* alimentam-se dos tecidos foliares nos primeiros dias após a emergência da planta e no terceiro instar adentra o colmo da cana promovendo injúria direta (PINTO *et al.*, 2009). A penetração dos fungos fitopatogênicos é favorecida indiretamente pelo inseto, causando o sintoma da podridão vermelha do colmo e queda na produção de açúcar e álcool (SENÔ *et al.*, 2010).

Um dos métodos utilizados para o controle da *D. saccharalis* é o biológico. O inimigo natural *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) têm se mostrado eficiente regulador desta lagarta, principalmente por uma crescente tendência na diminuição do uso de produtos químicos na agricultura (JIALE *et al.*, 2010).

Os fungos entomopatogênicos podem ser utilizados no combate de pragas da cultura cana-de-açúcar sendo outro importante agente de controle biológico (TIAGO *et al.*, 2011). São 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos, destacando-se a espécie *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) que há muito tempo é estudada e utilizada para controlar a cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) (LOUREIRO *et al.*, 2005).

O controle biológico nas culturas tem como finalidade manter as espécies de pragas em níveis tecnicamente aceitáveis através da introdução de um predador natural, parasitoide ou microrganismo que lhe cause doença ou morte (DINIZ *et al.*, 2008). Essa tecnologia para o controle de insetos é utilizada há muito tempo e tornou-se interessante por razões ambientais e econômicas (MACEDO *et al.*, 2009). No entanto, pesquisas que esclareçam a coexistência do entomopatógeno *M. anisopliae* e *C. flavipes* no mesmo ambiente devem ser efetuadas para que se verifique o efeito do fungo sobre o parasitoide.

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito dos isolados de *M. anisopliae* sobre adultos de *C. flavipes*, em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O ensaio experimental composto por um delineamento inteiramente casualizado (DIC) contendo a testemunha (não tratada), 15 tratamentos com 5 repetições e 10 adultos de *C. flavipes* recém de emergidos por repetição. As suspensões de conídios, utilizadas no experimento, foram obtidas a partir de colônias jovens dos isolados IBCB 425, IBCB 348 e UFGD 05 de *M. anisopliae*.

Para a montagem do bioensaio, dos isolados de *M. anisopliae*, foram preparadas suspensões em solução de Tween 80[®] a 0,1% nas concentrações de $1,0 \times 10^7$; $0,5 \times 10^8$; $1,0 \times 10^8$; $0,5 \times 10^9$ e $1,0 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ aferidas mediante quantificação em câmara de Neubauer[®] com o auxílio de um microscópio óptico (ALVES *et al.*, 1998). Os adultos de *C. flavipes* foram expostos ao fungo *M. anisopliae* em tubos de plástico tipo Falcon[®] contendo uma porção de papel filtro inoculado com 1 mL de suspensão e uma gota de mel na parede do tubo com a função de nutrir o parasitoide durante a condução do ensaio experimental. Na testemunha, o papel filtro foi tratado com água destilada esterilizada contendo Tween 80[®] a 0,1 e na parede do tubo inoculada uma gota de mel. Os tubos com os insetos foram mantidos em câmara climatizada a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Avaliou-se a mortalidade diariamente, durante 12 dias após a aplicação (DAA) dos fungos entomopatogênicos. Cada inseto morto foi transferido para placa de Petri com algodão hidrófilo umedecido

com água destilada esterilizada e novamente acondicionados em câmara climatizada para verificar da mortalidade confirmada.

A variável avaliada foi à mortalidade do parasitóide *C. flavipes* em porcentagem (%). Foi utilizada a estatística descritiva para a interpretação dos resultados (GOMES, 1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados amostrados, adultos do parasitóide *C. flavipes* expostos ao fungo IBCB 425 morrem logo no 7º DAA. O isolado nas concentrações de $1,0 \times 10^9$ e $0,5 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ causou 100% de mortalidade nos adultos do parasitóide *C. flavipes* (Tabela 1). Os dados não corroboram com os obtidos por Grance *et al.*, (2009) os autores avaliaram o efeito de seis isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Ascomycetes: Clavicipitaceae) sobre adultos do parasitóide *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu, 1942) (Hymenoptera: Eulophidae) e observaram que os isolados UFGD 10 ($1,0 \times 10^7$ e $0,5 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹), UFGD 06 ($1,0 \times 10^7$ e $0,5 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹) e ESALQ 446 ($1,0 \times 10^9$ e $0,5 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹) causaram menor efeito sobre *T. diatraeae*.

No tratamento com o isolado IBCB 348 observou-se que logo no 6º DAA na concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ foi capaz de provocar 100% de mortalidade nos adultos do parasitóide *C. flavipes* (Tabela 1). Os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados por Loureiro *et al.*, (2005) os autores relataram que o isolado IBCB 348 apresentaram mortalidade confirmada de 80% para as ninfas de *M. fimbriolata* tratadas com a concentração de $5,0 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹, ao sexto dia da aplicação (Tabela 1).

O isolado UFGD 05 causou mortalidade de 100% dos indivíduos aos 9º DAA, na concentração de $0,5 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ e as concentrações de $0,5 \times 10^9$, $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^7$ causaram mortalidade de 100% aos 10º DAA, sendo que a dose de $1,0 \times 10^8$ obteve a maior mortalidade no 8º DAA (Tabela 1). Em estudos conduzidos por Loureiro *et al.*, (2007) os isolados de *M. anisopliae* foram patogênicos ao predador *O. insidiosus*, com 100% de mortalidade confirmada aos 14 dias após a infecção com IBCB 121. Porém, esses valores, quando comparados com a patogenicidade dos mesmos aos pulgões *Aphis gossipy* (Glover, 1877) (Hemiptera, Aphididae) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera, Aphididae) demonstraram certo grau de seletividade em concentrações menores (LOUREIRO *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Média da mortalidade de *C. flavipes* submetidos à exposição de diferentes isolados de *Metarhiziumanisoplie* nos dias após a aplicação (DAA) em laboratório.

Tratamentos	% de redução (DAA)												
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	
IBCB 425	$1,0 \times 10^9$	0	13	30	46	77	76	100	100	100	100	100	100
	$0,5 \times 10^9$	0	11	32	54	73	76	100	100	100	100	100	100
	$1,0 \times 10^8$	1	8	26	46	75	81	82	84	100	100	100	100
	$0,5 \times 10^8$	0	8	31	45	75	84	88	100	100	100	100	100
	$1,0 \times 10^7$	1	15	30	38	65	68	68	69	70	100	100	100
	Testemunha	1	4	12	18	44	45	45	46	49	59	67	100
IBCB 348	$1,0 \times 10^9$	7	11	27	40	73	75	84	91	93	100	100	100
	$0,5 \times 10^9$	12	18	45	69	80	81	89	94	98	50	100	100
	$1,0 \times 10^8$	11	18	59	87	92	96	100	100	100	100	100	100
	$0,5 \times 10^8$	13	16	52	79	92	94	100	100	100	100	100	100
	$1,0 \times 10^7$	9	14	54	74	94	100	100	100	100	100	100	100
	Testemunha	0	12	23	31	40	43	43	43	46	46	47	100
UFGD 05	$1,0 \times 10^9$	4	25	43	59	77	86	86	86	93	100	100	100
	$0,5 \times 10^9$	4	32	45	58	69	80	86	92	96	100	100	100
	$1,0 \times 10^8$	0	13	29	38	68	81	89	100	100	100	100	100
	$0,5 \times 10^8$	3	10	13	35	67	88	94	97	100	100	100	100
	$1,0 \times 10^7$	0	12	27	38	55	81	91	94	98	100	100	100
	Testemunha	1	4	12	18	44	45	45	46	46	49	50	100

Observa-se ainda, que no presente estudo, as concentrações com maiores quantidades de conídios não foram aquelas que apresentaram maior porcentagem de mortalidade. A penetração dos fungos, principalmente quando utilizados em concentrações elevadas, causa o aparecimento de “orifícios” no tegumento dos insetos, os quais ficam, assim, sujeitos ao ataque de outros microrganismos (ALVES *et al.*, 1998). Nesse caso, microrganismos oportunistas (bactérias) acabam por colonizar o corpo do hospedeiro, causando septicemia, caracterizada pelo aspecto e odor, e impedindo o crescimento do patógeno primário, ou seja, o fungo entomopatógeno interferindo nos resultados de confirmação da mortalidade do inseto.

Outro fato atrela-se a variabilidade genética entre isolados é resultado da diferença na produção de enzimas (quitinases, proteases, lípases) e toxinas, na velocidade de germinação dos conídios, na atividade mecânica de penetração na cutícula e na capacidade de colonização dos isolados (PACCOLA-MEIRELLES *et al.*, 1990).

Por meio da interpretação dos dados pode-se constatar que os isolados de *M. anisopliae* apresentaram baixa virulência a *C. flavipes* em condições de laboratório, uma vez que não houve a confirmação da mortalidade. Assim, ressalta-se que baixa a longevidade da *C. flavipes* pode ter influenciado nos resultados obtidos no experimento, uma vez que o adulto do parasitoide possui ciclo de vida curto (CRUZ, 2007).

CONCLUSÃO

Nas condições em que foi conduzido o experimento, pode-se concluir que os isolados de *M. anisopliae* demonstraram apresentar baixa virulência ao parasitoide larval *C. flavipes*.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. FEALQ, 1998. Cap. 11, p. 289-381.

CONAB - **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso 07 set. 2011.

CRUZ, I. **Controle biológico de pragas na cultura de milho para produção de conservas (Minimilho), por meio de parasitóides e predadores**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo. 16p. 2007. (Circular Técnica).

DINIZ, F. R.; RODRIGUES, K. F.; ROSSI, M. M. Produção do parasitoide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) para controle biológico da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (Lepidoptera: Crambidae) **Nucleus**, Edição Especial, 2008.

GOMES, F.P. **Estatística experimental**. 10.ed. Nobel, 1982. 430 p.

GRANCE, E.L.V.*et al.* Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o parasitoide *Trichospilus Diatraeae* (Cherian E Margabandhu, 1942) (Hymenoptera: Eulophidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 11, 2009, Bento Gonçalves, RS. **Resumos...** Bento Gonçalves: 2009. CD ROOM.

JIALE, L.*et al.* O. Impact of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) as an augmentative biocontrol agent for the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) on Rice. **Biological Control**, v. 56, p.159-169, 2011.

-
- LOUREIRO, E. S. *et al.* Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. Contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v.34, p.791-798, 2005.
- LOUREIRO, E. S.; MOINO JUNIOR, A. Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 660-665. 2006.
- LOUREIRO, E. S.; MOINO JUNIOR, A. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). **BioAssay**, v.2, p.1-8, 2007.
- MACEDO, D.; ALVES S. B.; VIEIRA, A. S. Screening of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains against *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, p 47-52. 2006.
- PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; AZEVEDO, J. L. Natural variability in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Biotecnologia**, v.33, p.657-672, 1990.
- PINTO, A. S. **Guia ilustrado de pragas da cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2, 2009, 160 p.
- SENÔ, S. S.; SANDOVAL, K. C. A. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus**, v.7, n.1, 2010. Disponível em:
<http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/311/404> . DOI:
10.3738/1982.2278-311.
- SILVA, J. L. C. *et al.* Induction of a gloverin-like antimicrobial polypeptide in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* challenged by septic injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p. 431-436, 2010.
- TIAGO, P. V. *et al.* Differential pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and the control of the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p. 435-440, 2011.

