

CONTROLE MICROBIANO DA LAGARTA-ROSCA *AGROTIS IPSILON* (HUFNAGEL, 1766) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR FUNGOS FILAMENTOSOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Adna Cristina Barbosa de Sousa ¹

INTRODUÇÃO

A lagarta-roscas *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) é uma praga cosmopolita, tendo relatos de ocorrência em muitos países além do Brasil, onde possui uma facilidade de locomoção, devido ao adulto da praga poder voar até 1000 Km de distância. Ataca plântulas e folhas de várias culturas agrícolas, como cana-de-açúcar, milho, abóbora, abobrinha, acelga, agrião, alface, algodão, alho, batata doce, batata yacon, berinjela, beterraba, brócolis, cebola, chalota, chicória, chuchu, couve, couve-chinesa, couve-de-bruxelas, couve-flor, espinafre, feijão, fumo, gengibre, jiló, mandioquinha-salsa, maxixe, melancia, nabo, pimenta, pimentão, quiabo, rabanete, repolho, rúcula, soja, tomate e trigo (NAG; NATH, 1993).

Atualmente são adotadas duas formas de controle: químico e biológico. Para o controle químico é recomendado o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos e a eliminação antecipada de plantas invasoras hospedeiras. Em áreas menores é recomendado também a distribuição de iscas preparadas a base de farelo, melaço e um inseticida sem odor. Porém, essas estratégias não apresentam resultados satisfatórios para os produtores, além de serem altamente agressivas ao meio ambiente, fatos que aumentam a necessidade de alternativas para o combate da praga (MARQUES et al., 2016). Já o controle biológico apresenta inúmeras vantagens, especialmente em relação aos impactos ambientais, custo, manuseio, especificidade e ao desenvolvimento de resistência pelos organismos-praga. Entretanto, os bioinseticidas ainda apresentam uma baixa eficiência em relação ao tempo de morte do organismo alvo, quando comparado ao controle químico. Mas, esforços têm sido realizados com o intuito de potencializar o emprego do controle biológico (LOURENÇÃO et al., 1993).

¹ Professora/Pesquisadora do Centro de Biotecnologia: Doutora em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, adnasousa@cbiotec.ufpb.br

Entre os micro-organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os fungos filamentosos com ação entomopatogênica, pois estes não necessitam ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo alvo. Eles desenvolvem-se de forma ativa sobre o tegumento de seu hospedeiro (ALVES, 1998). Dentre os principais grupos/espécies de fungos entomopatogênicos destacamos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin e *Aspergillus* sp. Esses gêneros apresentam ação comprovada no controle biológico de vários insetos-praga (dípteros, himenópteros, ortópteros, coleópteros, lepidópteros e hemípteros) na agropecuária (ALVES et al., 2008). Baseado nessas informações, o nosso objetivo foi avaliar a especificidade e o potencial bioinseticida de *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Aspergillus* sp. sobre a lagarta-rosca *A. ipsilon*, visando contribuir para o desenvolvimento de alternativas mais eficazes e menos danosas ao ambiente para o controle desse inseto-praga.

METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal (L G M Biotec), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), *Campus I*, João Pessoa, Paraíba.

Origem das lagartas: as lagartas adultas de *A. ipsilon* foram adquiridas através da Empresa Pragas.com (<http://www.pragas.com.vc>).

Origens dos isolados fúngicos: foram utilizados três isolados fúngicos entomopatogênicos pertencentes à coleção de culturas fúngicas do L G M Biotec (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Aspergillus* sp.).

Preparo das suspensões de conídios: os três isolados fúngicos foram inoculados em meio de cultura Ágar-Sabouraud-Dextrose 2 % (5 g/L de peptona de carne, 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona de caseína e 15 g/L de ágar bacteriológico. pH $5,6 \pm 0,1$ a 25 °C). As placas foram mantidas à temperatura de 25 ± 2 °C, por um período de 10 a 15 dias para crescimento e conidiogênese. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície da colônia para a realização dos bioensaios. Para o preparo das suspensões de conídios, foi utilizada água destilada autoclavada e Tween 80 0,01 %

(v/v). Em seguida, foi estimada a concentração de conídios em câmara de Neubauer e as suspensões serão padronizadas em $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹.

Avaliação da viabilidade dos conídios: amostras dos conídios dos três isolados fúngicos foram tomadas e submetidas a diluições seriadas, até se obter uma concentração de 1×10^8 conídios/mL⁻¹. Desta suspensão, inoculou-se, em triplicata, 100 mL em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Ágar-Dextrose), que em seguida foram incubadas por 18 horas ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$). Após esse período, foram realizadas as contagens em cada placa, de 200 a 300 conídios viáveis ou não, sob microscópio de luz (aumento de 400×) (SENE et al., 2010).

Bioensaio - avaliação da atividade inseticida: a metodologia utilizada para o teste de patogenicidade foi adaptada a partir do trabalho de Santos et al. (2007). Foi realizado um experimento com 90 exemplares de lagartas-rosca, correspondendo a três repetições de 10 lagartas-rosca para cada tratamento (T1 Grupo controle= água destilada autoclavada + Tween 80; T2= suspensão de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ + Tween 80). As lagartas-rosca foram transferidas individualmente para placas de Petri contendo papel de filtro com 1 mL da suspensão de conídios e a dieta artificial de Greene (BUSATO et al., 2006). As placas foram mantidas à temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e avaliadas a cada 24 horas durante 15 dias, para observação da extrusão do fungo e confirmação da morte pelo patógeno.

Análise estatística: os experimentos foram realizados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, onde os dados foram analisados estatisticamente quanto à variância (teste F) e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2003). Os dados referentes à mortalidade confirmada foram submetidos à análise de Probit para obtenção dos valores de TL₅₀ (tempo letal), em dias (FINNEY, 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do bioensaio, as lagartas *A. ipsilon* (estágios de L3 a L5) apresentaram comportamento agitado, deslocando-se rapidamente em várias direções na placa de

Petri. Ao decorrer do experimento, as mesmas deslocavam-se cada vez mais lentamente, apresentando um comportamento letárgico. Além disso, durante os 15 dias do bioensaio, as lagartas também demonstraram visualmente uma diminuição gradativa no consumo da dieta de Greene.

Constatou-se que nos estágios iniciais, a infecção causou alterações fisiológicas como a diminuição dos movimentos, seguidos de paralisia e posterior mumificação da lagarta pelos isolados fúngicos. Foi constatado que as lagartas infectadas pelos fungos interperaram o seu desenvolvimento em relação ao grupo controle, ou seja, elas não passaram do estágio larval para o estágio de pupa. Extrusão do fungo não foi observada nos grupos controles, visto que não houve inóculo de conídios nos mesmos. Essas alterações fisiológicas e comportamentais também foram relatadas por Vey et al. (2002), onde os hospedeiros infectados [carrapato *Ixodes ricinus* (L.)] exibiam os primeiros sinais de colonização, que são: inquietação, perda de coordenação motora, parada de ingestão de alimentos e morte.

Os distúrbios fisiológicos gerados nos hospedeiros, provavelmente foram provocados pela produção de micotoxinas. As dextruxinas, metabólitos secundários produzidos pelos fungos, são as principais toxinas que afetam os canais de transportes de íons, envolvidos nas respostas musculares e na integridade das membranas celulares. Portanto, estes fatores apontam que as micotoxinas estão envolvidas na sintomatologia exibida nos primeiros estágios de infecção (SHAH; PELL, 2003).

A ação das micotoxinas produzidas por *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Aspergillus* sp. sob *A. ipsilon* foi considerada aguda, devido à eliminação por completo e rapidamente do controle nervoso sobre as funções do corpo do inseto. Resultados semelhantes foram observados em saúvas (*Atta* sp.) e moscas domésticas infectadas com *B. bassiana*, onde foi observado diminuição dos movimentos (ALVES, 1998).

B. bassiana, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Aspergillus* sp. promoveram uma taxa de mortalidade de $58,51 \pm 0,10$, $70,02 \pm 0,42$ e $60,02 \pm 4,90$, respectivamente, sobre *A. ipsilon* no período de 15 dias. No grupo controle obteve-se uma taxa de mortalidade de $1,32 \pm 0,10$, valor que pode ser atribuído ao estresse durante o experimento ou ao isolamento social das lagartas, uma vez que essas mortes não

poderiam ter sido causadas pelo fungo, posto que, como relatado anteriormente, não houve inóculo no grupo controle.

A viabilidade dos conídios e o tempo letal (TL₅₀) também foram avaliados no presente estudo. Os conídios de *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Aspergillus* sp. apresentaram uma viabilidade de 81%, 91% e 90%, respectivamente, e um TL⁵⁰ em dias de 9,35, 7,21 e 12,47, respectivamente.

Conhecer o TL₅₀ de um isolado é importante. A partir desse dado é possível tirar algumas conclusões a respeito da capacidade de infecção dos patógenos em relação ao tempo, bem como da susceptibilidade dos insetos à doença e, até mesmo, fazer previsões de controle de pragas (OLIVEIRA, 2013).

Diante dos dados obtidos, notou-se que os três isolados avaliados não dependem de um meio externo bastante nutritivo para dar início ao processo de infecção, visto que o tratamento contendo papel toalha umedecido, mesmo sendo ausente em nutrientes, garantiu a germinação dos conídios e crescimento na cutícula de *A. ipsilon*. Estes resultados comprovam a especificidade dos três fungos com o inseto. A maioria dos fungos entomopatogênicos requer, pelo menos, 95 % de umidade relativa na superfície do hospedeiro para iniciar o processo de germinação, extensão do tubo germinativo e infecção. A alta umidade relativa e a temperatura adequada são condições favoráveis para o crescimento do fungo e a ocorrência da doença, sendo que temperaturas altas e baixas retardam o crescimento e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença (MARQUES et al., 2016).

B. bassiana, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Aspergillus* sp. apresentaram potencial para uso no controle biológico de *A. ipsilon*, mas faz-se necessários ensaios no campo, em condições naturais, para avaliar a disseminação do patógeno através da dispersão de insetos contaminados e a capacidade de permanência do fungo sobre hospedeiros naturais no ambiente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nas condições estabelecidas e avaliadas neste estudo, conclui-se que *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Aspergillus* sp.

apresentou especificidade e efeito letal às lagartas de *A. ipsilon* (estágios L3-L5) na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL⁻¹.

Os três isolados apresentam potencial para ser explorado e posteriormente utilizado no controle biológico de *A. ipsilon*.

Palavras-chave: Biocontrole; Bioinseticida; Fungos entomopatogênicos.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A. TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, p. 69-110, 2008.

ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos**. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2ª. Edição. Piracicaba: FEALQ, p. 289, 1998.

BUSATO, R. G.; GARCIA, S. M.; LOECK, E. A.; ZART, M.; NUNES, M. A.; ODERLEI, B.; SILVA, A. F. Adequação de uma dieta artificial para os biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Instituto Agrônomo de Campinas Bragantia**, V.65, P.317-323, 2006.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: versão 4.3**. Lavras: DEX/UFLA, 2003.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

LOURENÇÃO, A. L. et al. Controle de *Sitophilus zeamais* em Milho com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Pirimifos metil*. **Ecosistema**, V.18, P.69-74, 1993.

MARQUES, A.; DIONÍSIO, L.; PALLERO-BUENO, F.; NETO, L. Estudo da capacidade entomopatogênica de fungos fitopatogênicos. **Actas Portuguesas de Horticultura**, V. 25, P. 114-119, 2016.

NAG, A.J.; NATH, P. Biology of cutworm *Agrotis ipsilon* (Hufn.) on some natural and an artificial food. **Naturalia São Paulo**, V.18, P.57-66, 1993.

OLIVEIRA, B. M. S.; MELO, C. R.; ALVES, P. B.; SANTOS, A. A.; SANTOS, A.C. C.; SANTANA, A. S.; ARAÚJO, A. P. A.; NASCIMENTO, P. E. S.; BLANK, A.F.; BACCI, L. Essential Oil of *Aristolochia trilobata*: Synthesis, Routes of Exposure, Acute Toxicity, Binary Mixtures and Behavioral Effects on Leaf-Cutting Ants. **Molecules**, V. 22, P.94-109, 2017.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, V. 61, P.413-423, 2003.

SANTOS, A.; ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; MENDONÇA, L. A.; SOUZA-SILVA, A.; MEDEIROS, A. G. B. Eficiência e custo de controle de ninhos de *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) com termonebulização. **Cerne**, V. 13, P. 23-27, 2007.

VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the peptide mycotoxin e on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. **Journal of Invertebrate Pathology**, V. 2, P. 104-127, 2002.