

Patogenicidade de *Beauveria bassiana* no controle *in vitro* da lagarta-da-espiga do milho (*Helicoverpa zea*)

Pathogenicity of *Beauveria bassiana* in *in vitro* control of the maize cob borer (*Helicoverpa zea*)

Everton Vinicius Zambiazzi^{1,*}, Scheila R. Guilherme¹, Janaina de N. Corassa², Solange M. Bonaldo², Alan M. Zuffo¹, Igor O. Soares¹ e Danyela de C. da S. Oliveira³

¹ Universidade Federal de Lavras (UFPLAS), Dpto. de Agricultura, Campus Universitário, CEP: 37200-000, Lavras-MG, Brasil;

² Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), CEP: 78557-267, Sinop-MT, Brasil;

³ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), CEP: 96001-970, Pelotas-RS, Brasil.

(* E-mail: everton_zambiazzi@hotmail.com)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA15002>

Recebido/received: 2015.01.11

Recebido em versão revista/received in revised form: 2015.05.11

Aceite/accepted: 2015.07.07

Resumo

Na cultura do milho uma das principais pragas é a lagarta-da-espiga, e seu controle é dificultado devido ao hábito desta espécie se alojar dentro da espiga. O controle microbiano de insetos com *Beauveria bassiana* constitui uma estratégia viável para minimizar os estragos, associando ao manejo integrado de pragas. Objetivou-se com este trabalho avaliar a patogenicidade de *B. bassiana* no controle *in-vitro* da lagarta-da-espiga do milho (*Helicoverpa zea*). O experimento foi realizado em laboratório, disposto em delineamento inteiramente casualizado, constituído por três tratamentos, duas concentrações, 1×10^8 e 5×10^6 conídios ml^{-1} , de *B. bassiana*, e a testemunha (H_2O), contendo 20 repetições cada tratamento. Foram avaliadas a patogenicidade (%) de *B. bassiana* em diferentes concentrações e o tempo médio (dias) para a mortalidade das lagartas (*H. zea*). Para o controle da lagarta-da-espiga do milho no tratamento constituído pela concentração 1×10^8 conídios ml^{-1} obteve-se 100% de mortalidade dos insetos em quatro dias. Conclui-se que *B. bassiana* foi eficiente para causar mortalidade *in-vitro* da lagarta-da-espiga do milho (*H. zea*).

Palavras-chave: controle biológico, fungos entomopatogênicos, inseto praga.

Abstract

In corn one of the main pests is the corn earworm, and its control is difficult due to the habit of staying within the spike. Microbial control of insects with *Beauveria bassiana* is a viable strategy to minimize damage by linking to integrated pest management. The objective of this study was to evaluate the pathogenicity of *B. bassiana* to control *in-vitro* corn cob borer (*Helicoverpa zea*). The experiment was conducted in laboratory arranged in a randomized design, consisting of three treatments, two concentrations 1×10^8 and 5×10^6 conidia ml^{-1} of *B. bassiana* and a control (H_2O), with 20 repetitions each treatment. Pathogenicity were evaluated (%) of *B. bassiana* at different concentrations and the time (in days) for mortality of caterpillars (*H. zea*). For the control of the corn cob caterpillar treatment consisting of the concentration 1×10^8 conidia mL^{-1} had 100% mortality of insects in four days. We conclude that *B. bassiana* has been effective in causing mortality *in vitro* maize cob caterpillar (*H. zea*).

Keywords: biological control, entomopathogenic fungi, insect pest.

INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância econômica devido ao valor nutricional de seus grãos e por seu uso intenso, nas alimentações humana e animal e como matéria-prima para a indústria, e social, por ser um alimento de baixo custo (Galvão *et al.*, 2014). Sendo assim, o milho está entre os cereais mais cultivados no mundo. No Brasil é o segundo grão mais cultivado, em uma área de $15.800,7 \times 10^3$ hectares com produção de $79.905,5 \times 10^3$ toneladas (CONAB, 2014).

Durante o processo de domesticação, foi possível produzir uma planta vigorosa, ereta e com maior eficiência na produção de grãos (Magalhães *et al.*, 2002). Entretanto, o ataque de pragas ainda é considerado um dos fatores mais importantes que contribuem para redução na produção da cultura do milho, destacando-se a lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) Lepidoptera: Noctuidae), como uma das principais pragas.

Como medidas de controle, utilizam-se tradicionalmente inseticidas químicos, porém, quando mal utilizados são passíveis de produzir impactos negativos no sistema agrícola, reduzindo a população de inimigos naturais ou ainda proporcionando o surgimento de populações de insetos praga resistentes. Cabe ressaltar que o controle da lagarta-da-espiga é dificultado pelo seu hábito de alojar-se dentro da espiga.

Nesse sentido, torna-se necessário a implementação de métodos de controle que sejam mais efetivos, que estimulem o uso do controle alternativo, destacando-se o controle biológico como opção ao controle químico de pragas, por reduzir riscos à saúde humana e ao ambiente (Cruz, 1995). Esse tipo de controle vem sendo cada vez mais utilizado, uma vez que é um importante passo para uma agricultura sustentável (Parra *et al.*, 2002).

Existem um grande número de espécies de fungos entomopatogênicos, que causam epizootias e que mantêm as pragas sob controle. Embora o seu uso no controle biológico não seja uma prática generalizada entre os agricultores, há avanços significativos em alguns cultivos, devido aos esforços de órgãos públicos de pesquisa (Martins, 2014).

Zambiazzi *et al.* (2012) constataram a eficiência do controle de percevejo-marron (*Euschistus heros*)

(Fab., 1974) (Heteroptera: Pentatomidae) com o uso de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, constituindo uma estratégia viável para minimizar os estragos causados por insetos.

Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar a patogenicidade de *B. bassiana* no controle *in-vitro* da lagarta-da-espiga do milho (*H. zea*), a fim de contribuir para o manejo integrado de pragas, principalmente no momento em que se discute a produção integrada rumo a uma agricultura sustentável.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia/Fitopatologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop, em fevereiro de 2011. O fungo utilizado foi produzido pela Koppert Biological Systems (produto comercial Boveril, estirpe ESALQ PL 63, com concentração de 2×10^9 conídios viáveis/g). A viabilidade dos conídios foi aferida pelo método de germinação, via espalhamento uniforme de 10 μ l de suspensão do isolado em três placas de Petri, com meio de cultura BDA + treptomicina. As placas foram mantidas em estufa incubadora, a 26°C, por 48 horas.

O experimento foi realizado com três tratamentos, nas concentrações de 1×10^8 e 5×10^6 conídios ml^{-1} de *B. bassiana* e a testemunha (H_2O), com 20 repetições em cada tratamento, constituída cada uma por uma larva, de acordo com a metodologia seguida por Tonet e Reis (1979) e Zambiazzi *et al.* (2012). Para a certificação das concentrações utilizadas no experimento, 1×10^8 e 5×10^6 conídios ml^{-1} , foi realizada a contagem dos esporos através de uma câmara Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico Zeiss a 400x.

Foram coletadas manualmente 60 lagartas *H. zea* em propriedade particular no município de Sinop, com as coordenadas geográficas 11°33'17.46" S e 55°32'55.79" W de longitude e latitude, respectivamente, 350 m de altitude, em região plana de Cerrado. A coleta de *H. zea* foi realizada na cultura do milho na segunda quinzena de fevereiro de 2011. No momento da coleta das lagartas, teve-se o cuidado em escolher larvas com dimensão semelhante, objetivando coletar todas no terceiro instar (entre 8 a 10 mm). As lagartas escolhidas estavam aparentemente saudáveis, não apresentavam sinal de fermentos e estavam se alimentando no

momento da coleta, não existindo sinal de contaminação por fungos e vírus. Os insetos coletados foram acondicionados individualmente em caixa de isopor com pedaços de espiga e o fundo da caixa forrado com papel-filtro, o qual foi permanentemente humedecido.

Os insetos foram transportados vivos para o laboratório de Microbiologia/Fitopatologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso. No laboratório os insetos foram acondicionados individualmente em placas de Petri (10 cm de diâmetro x 2 cm de altura), forradas com duas folhas de papel-filtro permanentemente humedecido com quatro borrifadas de água (2,8 ml) e devidamente identificadas por tratamento e repetição. As placas de Petri permaneceram sobre uma bancada, distanciadas 20 cm uma da outra, sendo que as larvas receberam a inoculação.

A calda foi preparada 30 minutos antes da aplicação em laboratório. Colocaram-se as lagartas na placa de Petri e, posteriormente, a inoculação dos esporos nas lagartas de *H. zea* foi realizada com auxílio de um pulverizador manual, sendo aplicada uma borrifada sobre cada inseto (cada borrifada possuía em média 0,7 ml, ou seja, aproximadamente $3,5 \times 10^6$ e 7×10^7 conídios, para as concentrações 1×10^8 e 5×10^6 respectivamente). A quantidade de água que foi utilizada para as suspensões de esporos do fungo foi de 200 ml para as duas concentrações dos tratamentos.

As lagartas de *H. zea* foram mantidas em câmara climatizada na temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa em torno de $72 \pm 10\%$, sendo alimentadas com pedaços de espigas de milho, trocadas diariamente. A avaliação da ação dos tratamentos sobre a mortalidade das lagartas foi realizada diariamente com a visualização das lagartas nas placas de Petri. Foi ainda anotado o número de dias necessários para causar mortalidade. O período de tempo em que cada inseto permaneceu vivo caracterizou a estimativa da sobrevivência.

Foram avaliados a patogenicidade *B. bassiana* para *H. zea*, medida pela mortalidade (%) e o tempo médio de morte (dias) das lagartas desta espécie. Para a variável patogenicidade, é apresentado um valor que corresponde a % total de mortalidade no total das 20 testadas. As médias do tempo letal foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de

significância utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O coeficiente de variação (CV) indica o grau de precisão na realização do experimento (Pimentel-Gomes, 2009). Neste caso, observou-se uma precisão de alta magnitude ($CV \leq 7\%$) para os caracteres avaliados. Os tratamentos diferiram estatisticamente, sendo que, a testemunha (H_2O) não provocou mortalidade nas lagartas de *H. zea* (Figura 1). Por outro lado, nota-se que as concentrações de 5×10^6 e 1×10^8 conídios ml^{-1} causaram mortalidade de 95% e 100% das lagartas em 6,6 e 3,9 dias, respectivamente (Figura 1).

De acordo com os resultados, *B. bassiana* apresenta patogenicidade elevada sobre a lagarta-da-espiga do milho. Entretanto, a estimativa da concentração letal varia com a estirpe do fungo, espécie de inseto praga e modo de aplicação (Ferron, 1977). Destaca-se que tem sido estabelecida, por vários autores, uma correlação positiva entre concentração e a mortalidade pelo fungo (Ribeiro *et al.*, 1994).

Alguns trabalhos apresentados na literatura demonstram o sucesso da utilização de *B. bassiana* em vários outros insetos pragas, como apresentado por Gomm (2008). Este autor estudou a eficácia de diferentes doses do formulado fúngico à base de *B. bassiana* no controle de adultos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). Nesse contexto, Zambiazzi *et al.* (2012) avaliaram o controle do percevejo-marrom com o uso de *B. bassiana*. Em ambos os trabalhos, observou-se resultados positivos com o uso de *B. bassiana* para o controle destes insetos.

Resultados promissores foram observados ao avaliar a suscetibilidade de *B. bassiana* testados a 1×10^8 conídios/ml sobre *Spodoptera litura*, verificando, após o sexto dia da inoculação dos fungos, 100% de mortalidade (Petlamul e Prasertsan, 2012).

Estudos para verificação da virulência de *B. bassiana* sobre *S. litura*, constataram que a porcentagem de mortalidade foi dependente da dose e do instar larval, visto que a maior concentração avaliada ocasionou a maior taxa de mortalidade para o menor instar larval (Sahayaraj e Borgio, 2010). Além disso, verificou-se também que a maior concentração

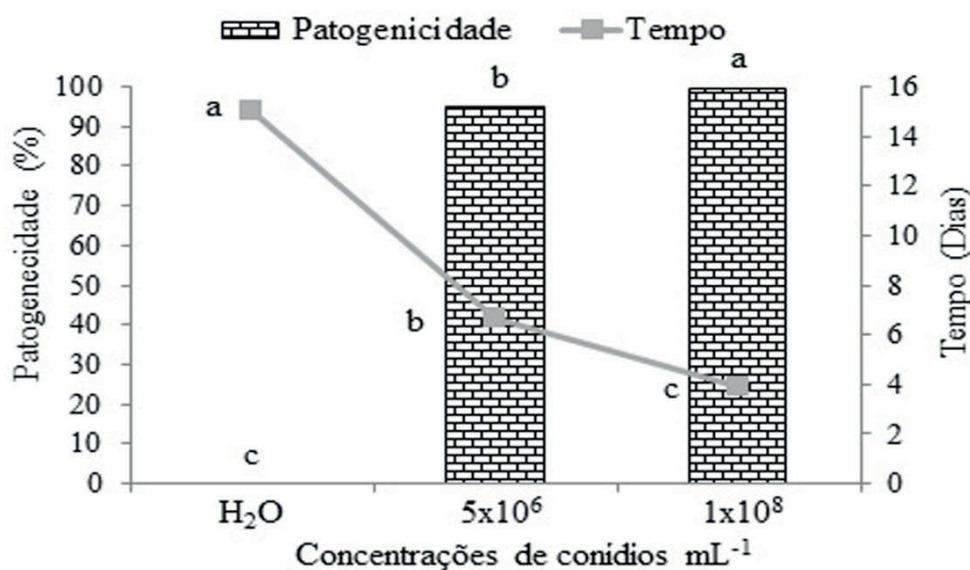


Figura 1 - Patogenicidade (%) e tempo médio para mortalidade (Dias) da *Helicoverpa zea*, (Lepidoptera; Noctuidae) após a inoculação de três tratamentos utilizados, testemunha (H₂O), 1x10⁸ e 5x10⁶ conídios mL⁻¹. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

de *B. bassiana* testada também acarretou as maiores reduções do período larval, da emergência de adultos, da longevidade, da fecundidade e da eclosão dos ovos de *S. litura* (Kaur *et al.*, 2011).

Para a lagarta-da-espiga, o tempo médio que *B. bassiana* levou para causar mortalidade da lagarta-da-espiga foi de 3,9 dias na concentração 1x10⁸ conídios mL⁻¹, enquanto na concentração 5x10⁶ conídios mL⁻¹ o tempo médio foi de 6,6 dias, considerando o dia da aplicação como data de início (Figura 1).

Conforme resultados apresentados por Tonet e Reis (1979) na avaliação da patogenicidade para hemíptero *Nezara viridula* (L.), o tempo médio de mortalidade, com taxa de mortalidade de 100% observado foi de 10 dias, sendo observados insetos mortos 24 horas após a inoculação. Estes mesmos

autores avaliaram a patogenicidade de *Beauveria bassiana* sobre *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae), também considerado inseto praga na cultura da soja, sendo observado maior suscetibilidade ao organismo, com tempo médio de mortalidade de cinco dias após a inoculação.

Vários autores obtiveram acréscimos nos níveis de mortalidade e redução dos tempos letais em função de acréscimos nas doses de *B. bassiana* aplicadas (Ribeiro *et al.*, 1994). Em estudo sobre as condições que influenciavam a infecção por *B. bassiana* em larvas de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) infectadas por *B. bassiana*, Fargues (1972), confirmou que a mortalidade das larvas está diretamente relacionada à dose empregada.

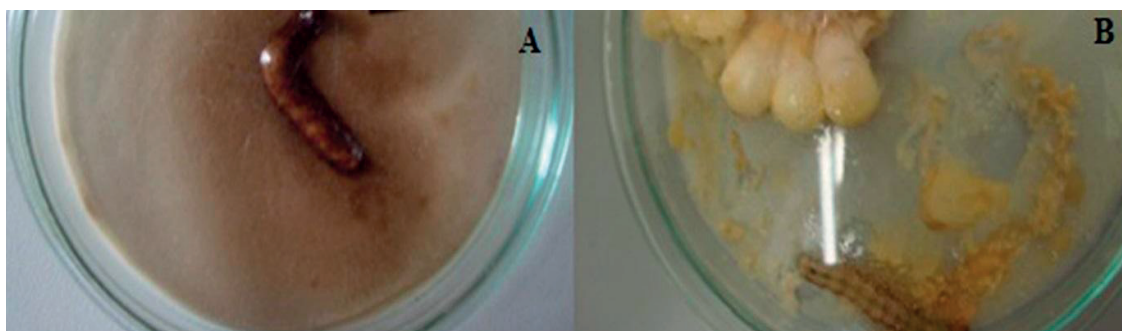


Figura 2 - A) *Helicoverpa zea* morta, sob o efeito de *B. bassiana* na concentração de 1x10⁸ conídios mL⁻¹ 15 dias após a inoculação. B) *Helicoverpa zea* viva, no tratamento da testemunha após 15 dias. Sinop-MT, 2011.

Até o último dia da avaliação, as lagartas da espiga que foram infectadas e morreram pela ação do fungo ficaram com aspecto enegrecido, entretanto, sem crescimento visível de hifas de *B. bassiana* (Figura 2A). Os sintomas apresentados pelas lagartas, ao entrarem em contato com *B. bassiana* foram perda de apetite, inatividade e após a morte o aparecimento de manchas negras sobre o corpo, o que pode ser caracterizado como efeito do fungo, conforme apresentado por Alves (1998). Isso também pode ser confirmado comparando imagens do aspecto das lagartas do tratamento testemunha (Figura 2B) com as lagartas dos tratamentos 1×10^8 conídios ml^{-1} (Figura 2A).

A eficácia de *B. bassiana* testada em laboratório para o controle de *H. zea* conduz a que novos experimentos sejam realizados com outros insetos pragas de interesse em culturas de importância econômica. Contudo, recomenda-se realizar o experimento em condições de campo para verificar se a eficiência de *B. bassiana* se mantém nessas condições.

CONCLUSÃO

Beauveria bassiana na concentração de 1×10^8 conídios ml^{-1} provocou 100% da mortalidade em larvas de *H. zea* em cerca de quatro dias em condições de laboratório.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais) pela concessão de bolsas de Doutorado e à Universidade Federal do Mato Grosso pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, S.B. (1998) - *Controle microbiano de insetos: Fungos entomopatogênicos*. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, p. 289-381.
- CONAB (2014) - *Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, Agosto 2014*. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília: CONAB, 87p.
- Cruz, I.; Waquil, J.M.; Viana, P.A. e Valicente, F.H. (1995) - *Pragas: Diagnóstico e controle*. Arquivo do agrônomo nº 2 (Embrapa/Cnpms) – Sete Lagoas, MG, 14 p.
- Fargues, J. (1972) - Etude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Fungiim perfecti). *Entomophaga*, vol. 17, p. 319-337.
- Ferreira, D.F. (2011) - Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 35, n. 6, p. 1039-1042.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Ferron, P. (1977) - Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae). *Entomophaga*, vol. 22, n. 4, p. 393-396.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02373264>
- Galvão, J.C.C.; Miranda, G.V.; Trogello, E. e Fritsche-Neto R. (2014) - Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. *Revista Ceres*, vol. 61, p. 819-828.
<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201461000007>
- Gomm, P.C. (2008) - *Eficácia de diferentes dosagens do formulado fúngico à base de Beauveria bassiana (Vuill, 1912) no controle de adultos de Hedypathes betulinus (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae)*. Dissertação de Graduação. Ponta Grossa, Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- Kaur, S.; Kaur, H.P.; Kaur, K. e Kaur, A. (2011) - Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Biopesticides*, vol. 4, n. 2, p. 161-168.
- Magalhães, P.C.; Durães, F.O.M.; Carneiro, N.P. e Paiva, E. (2002) - *Fisiologia do milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA – CNPMS, p.23 (EMBRAPA – CNPMS. Circular Técnica, 22).
- Martins G.L.M. (2014) - *Manejo de pragas agrícolas com fungos entomopatogênicos*.
<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=383>.
- Parra, J.R.P.; Paterniani, E. e Filho Neto, R.M. (2002) - Importância da agricultura para o Brasil. *Revista Parcerias Estratégicas*, vol. 4, p. 11-31.
- Pimentel-Gomes, F. (2009) - *Curso de estatística experimental*. 15ª Ed. Piracicaba: FEALQ, 451 p.
- Petlamul, W. e Prasertsan, P. (2012) - Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology*, vol. 40, n. 2, p. 111-116.
<http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.2.111>

- Pimentel-Gomes, F. (2009) - *Curso de estatística experimental*. 15ª Ed. Piracicaba, FEALQ, 451 p.
- Ribeiro, M.M.; Santos, H.R. e Diodato, M.A. (1994) - Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* em *Hedyphathes betulinus* Bals Vuill, Klug (1825) praga da erva-mate *Ilex paraguariensis* Saint Hil. *Revista do Setor de Ciências Agrárias*, vol. 13, p. 1-3.
- Sahayaraj, K. e Borgio, J.F. (2010) - Virulence of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on seven insect pests. *Indian Journal of Agricultural Research*, vol. 44, p. 195-200.
- Tonet, G.L. e Reis, E.M. (1979) - Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos pragas da soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, vol. 14, n. 1, p. 89-95.
- Zambiazzi, E.V.; Corassa, J. de N.; Guilherme, S.R. e Bonaldo, S.M. (2012) - Controle biológico *in-vitro* do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) com *Beauveria bassiana*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, vol. 6, n. 2, p. 43-48.