

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCEPTIBILIDADE DAS FASES DO CICLO DE VIDA DE
Diatraea saccharalis (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À AÇÃO
DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Lucas Detogni Simi
Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCEPTIBILIDADE DAS FASES DO CICLO DE VIDA DE
Diatraea saccharalis (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À AÇÃO DE
FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS**

Lucas Detogni Simi

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2010

S589s Simi, Lucas Detogni
Susceptibilidade das fases do ciclo de vida de ***Diatraea saccharalis*** (Lepidoptera: Crambidae) à ação de fungos entomopatogênicos / Lucas Detogni Simi. – – Jaboticabal, 2010
xiii, 64 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Antonio Carlos Monteiro
Banca examinadora: Odair Aparecido Fernandes, Luis Garrigós Leite.

Bibliografia

1. ***Metarhizium anisopliae***. 2. ***Neauveria bassiana***. 3. ***Isaria farinosa***. 4. Controle Biológico. 5. Patogenicidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937:595.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

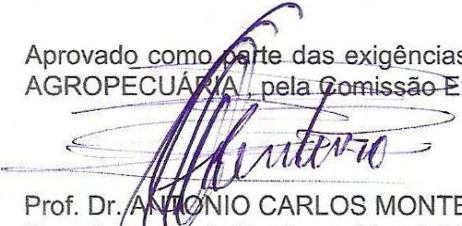
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: SUSCEPTIBILIDADE DAS FASES DO CICLO DE VIDA DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS

AUTOR: LUCAS DETOGNI SIMI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

Departamento de Producao Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. LUIS GARRIGÓS LEITE

Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico / Campinas/SP



Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 15 de julho de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS DETOGNI SIMI – Filho de Agostinho Simi e Zaira Isabel Detogni, nascido no município de Jaboticabal-SP, em 17 de agosto de 1984. Biólogo, graduado pelo Centro Universitário Barão de Mauá em Janeiro de 2006. Estagiou no Laboratório de Ecologia de Microrganismos de Fevereiro de 2006 a Agosto de 2007. Mestrando em Microbiologia Agropecuária pela UNESP- Campus de Jaboticabal, com início em março de 2008, sendo bolsista da CAPES. Durante o período de estágio e do curso de mestrado participou de congressos e publicou trabalhos na área de controle microbiano de insetos. Obteve o título de mestre em Microbiologia Agropecuária em Julho de 2010.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”*

Louis Pasteur
1822-1895

Às pessoas mais importantes da minha vida,

Minha mãe Zaira, meu pai Agostinho, e meu padrasto Waldir

As pessoas que fizeram todo o possível para que este sonho fosse realizado. Por sempre estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins. Por serem a segurança que precisei nos momentos de dificuldade. Por me apoiarem quando foi preciso e me guiarem pelo caminho correto, por todo o amor.

Meus Irmãos Felipe e Matheus

Pelo companheirismo, cumplicidade e pelo apoio que somente um irmão é capaz de dar.

Dedico

Aos meus tios Ana Érica e Mozar e minha madrinha Cristina.

Pela ajuda e por sempre me incentivarem, em todos os momentos da
minha vida

Aos meus avós Victorio (*in memoriam*) e Geni

Por tantas alegrias e carinhos, por sempre me protegerem até quando eu
não estava certo

Às minhas primas Monize, Mellize, Adriana e Jane

Pelos bons momentos, pela atenção e pelo carinho

Ofereço

À minha grande amiga Aline Almeida

Por ter me dado todo o apoio, pelas idéias, pela competência, pela dedicação ao meu trabalho como se fosse próprio, pelas conversas e incentivo, e principalmente pela amizade e carinho, sem a qual meus dias seriam muito mais difíceis

Ao meu grande amigo Marcos Valério Garcia

Pelos conselhos, por todo o conhecimento e experiência que a mim foi passado, por ser rígido quando foi necessário e pelo carinho em todos os momentos

Agradeço em especial

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter guiado minha trilha, protegido meus passos, inspirado meus pensamentos, e iluminado meu caminho no desenvolvimento deste trabalho.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP**, Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/**CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos no curso de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro**, pela oportunidade, confiança, atenção, ensinamentos e acima de tudo, pela amizade.

Aos professores **Dr. Luis Garrigós Leite** e **Dr. Odair Aparecido Fernandes**, pela disponibilidade em participar da banca examinadora, pelas correções e conselhos, tão necessários e fundamentais à este trabalho.

Aos professores **Dr. Sergio Antonio de Bortoli** e **Dr. Ely Nahas**, pela participação essencial neste trabalho, e pela disponibilidade em participar da banca examinadora de qualificação.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Barbosa** pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao funcionário do Centro de Tecnologia Canavieira, **Dr. Luiz Carlos de Almeida**, pelos conhecimentos passados, pela disponibilidade e pelos insetos fornecidos.

À funcionária da Usina Santa Adélia, **Dagmara Gomes**, por sempre fazer o possível para atender meus pedidos e pelos insetos fornecidos.

Aos meus amigos de laboratório **Aline Almeida, Dinalva Mochi, Marcos Valério, Danilo da Matta, Flávia Barbosa, Ana Carolina, Aline Botelho, Carime Moraes, Manuela Teodoro, Nancy Prette, Lourenço Lanza e Luciana Yoshida**, pelo companheirismo, ensinamentos, auxílio e dedicação.

As estagiárias **Agatha, Mariana e Elisa**, pela ajuda e auxílio sempre oportunos.

Às funcionárias do Departamento de Microbiologia da FCAV, **Edna D'áquila**, e **Rosângela de Andrade Vaz**, pela atenção, cuidados prestados, conselhos e amizade.

Aos pós-graduandos do Departamento de Entomologia, **Natália Miranda, Alessandra Marieli e José Rossato Jr.**, pela amizade, pelas informações preciosas e pela ajuda no planejamento dos experimentos.

Aos amigos **Bruno Belesso, Thalita Louise, Karina Parada, Karla Parada, Catarina Horta, Fernanda Mangolini, Giseli Ferracini, Rafael Coelho, Renan Lopes, Inês Garcia, Hurzana de Mello, Diane Veloso, Thais Mariano, Gabriela Borges, Patricia Vieira e Isabela Facchina**, pela amizade e carinho, essencial e imprescindível durante a realização deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos, que com pequenos e grandes atos, incentivaram e cooperaram para que este trabalho fosse realizado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR.....	iv
SUMÁRIO	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Fungos Entomopatogênicos.....	3
3.2. <i>Diatraea saccharalis</i>	4
3.2.1. Biologia	4
3.2.2. Danos	5
3.2.3. Controle	6
3.2.4. O Controle Biológico	6
IV. REFERÊNCIAS	8
CAPÍTULO 2 – APLICAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS EM OVOS E LAGARTAS DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	12
I. INTRODUÇÃO	14
II. OBJETIVOS.....	15
III. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Insetos.....	16
3.2. Fungos	16
3.3. Bioensaio com massas de ovos de <i>D. saccharalis</i>	16

3.4. Bioensaio com lagartas de <i>D. saccharalis</i>	17
3.5. Delineamento experimental e análise estatística	18
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Bioensaios com massas de ovos de <i>D. saccharalis</i>	19
4.2. Bioensaios com lagartas de <i>D. saccharalis</i>	21
V. CONCLUSÃO.....	24
VI. REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 3 – EFEITOS CAUSADOS PELA APLICAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NAS FASES DE PUPA E ADULTO DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR	29
I. INTRODUÇÃO	31
II. OBJETIVO	32
III. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Insetos.....	32
3.2. Fungos	32
3.3. Bioensaio com pupas de <i>D. saccharalis</i>	33
3.4. Bioensaio com adultos de <i>D. saccharalis</i>	34
3.5. Delineamento experimental e análise estatística	34
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Bioensaios com pupas de <i>D. saccharalis</i>	35
4.2. Bioensaios com adultos de <i>D. saccharalis</i> :.....	39
V. CONCLUSÃO.....	42
VI. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ovos (A) e lagartas (B) de *Diatraea saccharalis* apresentando extrusão do fungo *Metarhizium anisopliae*..... 18
- Figura 2.** Gaiola de PVC utilizada para acondicionar adultos de *Diatraea saccharalis*..... 33
- Figura 3.** Pupas (A) e adultos (B) de *Diatraea saccharalis* apresentando extrusão do fungo *Metarhizium anisopliae*..... 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Viabilidade e período de incubação de ovos de *Diatraea saccharalis* tratados com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*, e os efeitos desses fungos no período e viabilidade das lagartas eclodidas..... 20
- Tabela 2.** Mortalidade, período e viabilidade de lagartas de *Diatraea saccharalis* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*, e seus efeitos sobre as pupas formadas..... 22
- Tabela 3.** Mortalidade, período pupal e viabilidade de pupas de *Diatraea saccharalis* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*..... 36
- Tabela 4.** Longevidade e fecundidade de adultos de *Diatraea saccharalis* emergidos de pupas tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*..... 38
- Tabela 5.** Mortalidade, longevidade e fecundidade de adultos de *Diatraea saccharalis* tratados com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*..... 40

SUSCEPTIBILIDADE DAS FASES DO CICLO DE VIDA DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

RESUMO: A broca da cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) é responsável por grandes prejuízos na cultura da cana-de-açúcar. O controle tem como alvo principal somente a fase de lagarta. No entanto, a eficiência pode ser maior atingindo fases do ciclo da praga mais expostas aos agentes de controle. O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. para ovos, lagartas, pupas e adultos de *D. saccharalis* e avaliar, através da análise de parâmetros biológicos, os efeitos no ciclo de vida da praga. Ovos postos no período de 24 horas, lagartas com 15 dias de desenvolvimento, pupas recém formadas e adultos com 24 horas de vida foram inoculados com os fungos nas concentrações de 10^8 , 10^7 e 10^6 conídios mL⁻¹. A viabilidade dos ovos foi afetada significativamente no tratamento com 10^8 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae*, mas as lagartas sobreviventes não foram afetadas em nenhum outro parâmetro avaliado. *M. anisopliae* e *B. bassiana* causaram mortalidade de lagartas principalmente nas concentrações de 10^8 e 10^7 con. mL⁻¹, enquanto a viabilidade pupal e o peso de pupas fêmeas formadas a partir de lagartas tratadas foram reduzidos apenas pelos tratamentos com 10^8 e 10^7 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae*, respectivamente. *I. farinosa* não se mostrou patogênico para as fases de ovo e lagarta de *D. saccharalis*. O tratamento com 10^8 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae* e *B. bassiana* produziu 52,0 e 42,0% de mortalidade de pupas, respectivamente, afetando também a viabilidade de pupas e a longevidade de adultos emergidos. A fecundidade destes adultos foi severamente afetada por *I. farinosa* na concentração 10^8 con. mL⁻¹ e pelos outros fungos em todas as concentrações avaliadas. Verificou-se grande mortalidade de adultos tratados com todas as concentrações de *M. anisopliae* e com 10^7 con. mL⁻¹ de *B. bassiana*. A longevidade e a fecundidade não foram afetadas pelos fungos, e a viabilidade dos

ovos postos pelas fêmeas tratadas foi significativamente reduzida pelo tratamento com 10^6 e 10^8 con. mL⁻¹ de ***B. bassiana***. A aplicação de ***M. anisopliae*** em ovos diminuiu a eclosão de lagartas, e de ***B. bassiana*** em adultos, reduz a viabilidade dos ovos postos pelas fêmeas. Portanto, este estudo mostrou que tais fungos podem ser eficientes no controle de outras fases do ciclo de vida da broca da cana, além da fase larval.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *Diatraea saccharalis*, controle biológico, patogenicidade.

SUSCEPTIBILITY OF *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) LIFECYCLE STAGES TO ACTION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

SUMMARY: The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) is responsible for high losses in sugarcane. The larval stage is the main target of control. However, the efficiency can be higher by reaching different and more exposed stages with more exposure to the control agents. The aim of this study was to evaluate the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. to eggs, larvae, pupae and adults of *D. saccharalis* and to evaluate the effects on pest lifecycle. Eggs with 24 hours, larvae with 15 days of development, newly formed pupae and adults with 24 hours of life were inoculated with fungi at concentrations of 10^8 , 10^7 and 10^6 conidia mL⁻¹. The eggs viability was significantly affected in the treatment with 10^8 con. mL⁻¹ of *M. anisopliae*, but the survival larvae were not affected in any of the analyzed parameters. *M. anisopliae* and *B. bassiana* caused larval mortality mainly at concentrations of 10^8 and 10^7 con. mL⁻¹, while pupae viability and female pupal weight formed from treated larvae were reduced only by treatments with 10^8 and 10^7 con. mL⁻¹ of *M. anisopliae*, respectively. *I. farinosa* wasn't pathogenic to eggs and larvae of *D. saccharalis*. The treatment with 10^8 con. mL⁻¹ of *M. anisopliae* and *B. bassiana* produced 52.0 and 42.0% pupae mortality respectively, also affecting the pupal viability and the longevity of adults. The fecundity of these adults was severely affected by *I. farinosa* in the concentration of 10^8 con. mL⁻¹ and by other fungi in all evaluated concentrations. High mortality of treated adults with all concentrations of *M. anisopliae* and with 10^7 con. mL⁻¹ was observed. The longevity and fecundity were not affected by the fungi, and the eggs viability laid by treated females was significantly reduced by treatment with 10^6 and 10^8 con. mL⁻¹ of *B. bassiana*. The *M. anisopliae* application in eggs reduced the larvae hatching, and of *B. bassiana* in adults, reduces

the eggs viability laid by females. So, this study showed that the evaluated fungi can be efficient in control of othe stages of sugarcane borer lifecycle, besides larva.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *Diatraea saccharalis*, biological control, pathogenicity.

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

I. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar, com área total plantada de 9.694.448 hectares (IBGE, 2009). O aumento da procura pelo etanol tem criado grandes expectativas no mercado sucroalcooleiro. Por ser um combustível renovável, mais econômico e menos poluente que os combustíveis fósseis, o etanol teve ampla aceitação no mercado brasileiro e tem atraído a atenção dos países da comunidade européia, Japão e os Estados Unidos, que além de diminuir a emissão dos gases que causam o efeito estufa, também querem diminuir sua dependência do petróleo.

Com o aumento da demanda, a área de plantio da cana-de-açúcar tem aumentado a cada ano. Em 2009, a produção nacional foi de cerca de 690 milhões de toneladas, 6,6% superior a 2008 (IBGE, 2009), impulsionada pelo aumento crescente da demanda por etanol, que fez com que as usinas expandissem a área cultivada nos últimos anos. O Estado de São Paulo, com uma produção de 346.293.389 toneladas, é responsável por aproximadamente 50% da produção nacional de cana-de-açúcar. Para o ano de 2010, espera-se, que a produção paulista ultrapasse os 370 milhões de toneladas, com 70% de sua colheita mecanizada, empregando cerca de 200 mil trabalhadores, entre a indústria, colheitas mecanizada e manual (ÚNICA, 2009).

Para manter a elevada produtividade da cana-de-açúcar, muito tem sido investido no estabelecimento e condução da cultura destacando-se diversos aspectos como o Manejo Integrado de Pragas, principalmente pelo uso de novas alternativas de controle (GALLO et al., 2002).

As extensas áreas de cultivo de cana-de-açúcar distribuídas por todo território brasileiro, porém, mais adensadas no Estado de São Paulo, bem como a região climática em que se encontram, propiciam um agroecossistema muito

favorável ao desenvolvimento de insetos-praga. Dentre elas, a broca da cana-de-açúcar ***Diatraea saccharalis*** (Lepidoptera: Crambidae) é considerada uma das pragas mais importantes, devido a sua sazonalidade e alta frequência de ocorrência, gerando danos e prejuízos à cultura (PINTO et. al., 2006).

Os fungos entomopatogênicos ***Beauveria bassiana*** (Bals.) Vuill., ***Metarhizium anisopliae*** (Metsch.) Sorok e ***Isaria farinosa*** (= ***Paecilomyces farinosus***), são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de inúmeras pragas agrícolas. Essas espécies apresentam potencial de controle para diversas ordens de insetos (BRIDGE et al. 1990, ALVES 1992, PEREIRA et al. 1993), inclusive para lepidópteros pragas, como ***Plutella xylostella*** (L.) (VANDEMBERG et al., 1998), ***Alabama argillacea*** (Huebner) (CÉSAR FILHO, 2000), ***Mamestra brassicae*** e ***Spodoptera littoralis*** (MANIANIA & FARGUES, 1992) bem como ***D. saccharalis*** (ALVES et al. 1984).

Contudo, na fase larval de ***D. saccharalis***, apesar de susceptível a fungos, o controle é dificultado, já que após a eclosão, o inseto alimenta-se do parênquima foliar, em direção a bainha da folha, e na passagem para o segundo instar já penetra no colmo, ficando mais protegido (GALLO et al. 2002). Sendo assim, a fase do inseto que se encontra mais exposta para a aplicação seria a de ovo, localizado comumente na parte dorsal das folhas. Porém, são escassos os trabalhos na literatura avaliando a patogenicidade de tais fungos para esta e as demais fases do ciclo de vida do inseto, bem como os efeitos causados nos parâmetros biológicos da broca.

II. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade de ***M. anisopliae***, ***B. bassiana*** e ***I. farinosa*** para ovos, lagartas, pupas e adultos de ***D. saccharalis*** e avaliar, através da análise de parâmetros biológicos, os efeitos no ciclo de vida da praga.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Fungos Entomopatogênicos

Os fungos entomopatógenos vêm sendo estudados, no Brasil, há mais de sessenta anos. Um programa muito conhecido de utilização de fungo neste país é o do controle da cigarrinha ***Mahanarva posticata*** (Stal, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar (ALVES, 1998). O controle microbiano das cigarrinhas que atacam pastagens e a cana-de-açúcar é um dos programas mais antigos, com a aplicação do fungo ***M. anisopliae*** que, normalmente, é encontrado causando epizootias em populações desses insetos. No caso da cana-de-açúcar, destaca-se o controle da cigarrinha-da-raiz ***Mahanarva fimbriolata*** (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), que tem causado grandes prejuízos na lavoura devido à proibição da queima da cana na colheita, o que força os produtores e as usinas a investirem na pesquisa, produção e aplicação de ***M. anisopliae*** (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2001).

Assim, dependendo das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, além das condições nutricionais e da grande suscetibilidade, o hospedeiro é infectado, geralmente, através do tegumento com a adesão, germinação e penetração dos conídios por meio de forças físicas, pelo rompimento do tegumento, e químicas, pela elaboração de enzimas que provocam a histólise dos tecidos da cutícula. O fungo então ramifica-se colonizando o hospedeiro desde os corpos gordurosos, até o sistema nervoso, o que provoca a morte do inseto devido a produção de micotoxinas e ao esgotamento de nutrientes (ALVES, 1998).

Os fungos são patógenos de largo espectro. São capazes de atacar insetos aquáticos e fitófagos que vivem na parte aérea das plantas e no solo, podendo causar epizootias naturais. Podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo esta uma característica muito desejável e peculiar deste grupo. Alguns são virulentos e

a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só atacam o inseto por infecção via oral, penetrando através do mesêntero (ALVES, 1998).

Segundo ALVES (1998), a seleção se isolados é a base para uma implantação de um programa de controle bem sucedido, representando também uma etapa inerente no desenvolvimento de um bioinseticida. Este procedimento é recomendado principalmente devido à enorme variabilidade genética existente entre os entomopatógenos, o que lhes confere diferentes e importantes características como patogenicidade e virulência a grupos específicos de insetos. Para lagartas de ***D. saccharalis***, ZAPPELINI (2009) encontrou uma diferença entre isolados que variou de 10% a 90% na capacidade de causar mortalidade.

3.2. *Diatraea saccharalis*

É a principal praga da cana-de-açúcar, sendo provavelmente originária da América do Sul (GALLO et al., 2002).

3.2.1. Biologia

Segundo GALLO et al. (2002), os ovos são colocados geralmente na face dorsal das folhas, com um agrupamento muito característico semelhante a uma escama de peixe. As massas de ovos contêm em média de 5 a 50 ovos e a fêmea durante seu ciclo pode colocar de 300 a 600 ovos, os quais demorarão em torno de quatro a nove dias para que ocorram as primeiras eclosões de larvas. As lagartas recém-nascidas alimentam-se inicialmente do parênquima foliar, e direção à bainha. Após sua primeira ecdise, penetram no colmo e abrem galerias de baixo para cima. Estas galerias podem ser longitudinais, mais comuns, ou transversais. Ao atingirem o completo desenvolvimento, em média aos 40 dias, medem cerca

de 22 a 25 mm de comprimento, apresentando coloração amarelo-pálida e cabeça marrom. Fazem então um orifício para o exterior, fechando-o com fios de seda e serragem, empupam, e após um período que varia de 9 a 14 dias, das pupas, de coloração marrom castanha, emergem os adultos, que saem pelo orifício anteriormente feito pela lagarta. O adulto é uma mariposa com as asas anteriores de coloração amarelo-palha, com alguns desenhos pardacentos, e asas posteriores esbranquiçadas, com 25 mm de envergadura. As fêmeas são maiores, com abdômen dilatados e os machos com o último par de pernas cobertos por cerdas, possuem em média 2 a 9 dias de longevidade (GALLO et al., 2002; PINTO et al., 2006). O ciclo evolutivo completo é de 53 a 60 dias, e podem dar até quatro gerações anuais, em casos excepcionais até cinco, dependendo das condições climáticas. Na última geração, há um alongamento do ciclo, ficando a lagarta no interior do colmo por 5 a 6 meses. As gerações podem se desenvolver tanto nos colmos da cana como nos do milho.

3.2.2. Danos

Os danos provocados pela lagarta de *D. saccharalis* podem ser diretos, por meio de abertura de galerias no interior do colmo da planta, que provocam a morte das gemas, falhas na germinação e reduzem o fluxo de seiva, além de torná-la mais suscetível ao tombamento pela ação do vento e chuvas. Em plantas mais novas, a broca causa a seca dos ponteiros, chamado de “coração morto”; os danos indiretos ocorrem quando os as aberturas geram uma porta de entrada para microrganismos fitopatogênicos no interior do colmo, como a podridão vermelha, que pode abranger toda a região compreendida entre as galerias atacadas, pela ação dos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme* (complexo broca-podridão), que invertem a sacarose, diminuindo assim a pureza e qualidade do caldo, além de um decréscimo no rendimento de álcool e açúcar (GALLO et al., 2002).

3.2.3. Controle

A época adequada para o controle é quando a intensidade de infestação é igual ou superior a 3%. A recomendação é que sejam tomadas medidas quando o monitoramento encontra 1000 lagartas há^{-1} , porém na prática, o NC (nível de controle) adotado é próximo de 500 lagartas há^{-1} . Segundo GALLO et al. (2002) há varias medidas que são tomadas contra a praga:

O controle cultural consiste no plantio de variedades resistentes à praga, o corte de cana sem desponte, moagem rápida, eliminação de plantas hospedeiras nas proximidades do canavial, como milho e milheto.

O controle químico recomendado para o controle desta praga consiste na aplicação em pulverização, nas proximidades do “palmito” (conjunto de folhas centrais), fazendo uso de algum dos produtos recomendados, tendo como ingredientes ativos o triflumuron (Alsystin 250 PM), lufenuron (Match CE), ou fipronil (Regent 800 GrD) (GALLO et al., 2002; MAPA, 2009). Esta última condição é vital no sucesso do controle, pois segundo DE BORTOLI et al. (2004), uma vez no interior do colmo, o contato do produto, tanto biológico quanto químico, com as lagartas torna-se muito difícil.

3.2.4. O Controle Biológico

Mais recentemente, com a conscientização do uso de produtos menos agressivos ao meio ambiente e a saúde humana, diversos centros de pesquisa vêm estudando agentes biológicos para o controle de pragas, com destaque para os fungos entomopatogênicos e parasitóides.

De modo geral, o controle biológico é realizado com sucesso através de parasitóides que são possíveis de serem produzidos em laboratório. Atualmente o manejo da broca da cana-de-açúcar vem sendo feito com o parasitóide larval ***Cotesia flavipes*** (Hymenoptera: Braconidae). As primeiras liberações massais no Brasil foram realizadas no ano de 1977 no Estado de São Paulo, expandindo-se

gradativamente nos anos seguintes. Os índices de parasitismo passaram de 0,14% em 1979 para 30 a 40% no fim da década de 90. O sucesso na utilização desta vespa foi devido as facilidades da produção massal em laboratórios de criação e a sua capacidade de localização da praga (BOTELHO & MACEDO, 2002).

Outro inimigo natural eficiente no controle da broca é o microhimenóptero *Trichogramma galloi* que ataca ovos de lepidópteros. O parasitóide pode ser produzido em larga escala em laboratórios e ser liberado no campo, regulando a população da praga (BOTELHO et al., 1995). Atualmente não há larga produção deste parasitóide.

Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de inúmeras pragas agrícolas. Essas espécies apresentam potencial de controle para diversas ordens de insetos (BRIDGE et al. 1990, ALVES 1992, PEREIRA et al., 1993), inclusive para lepidópteros pragas como *Plutella xylostella*, *Alabama argillacea* e *Diatraea saccharalis* (ALMEIDA, 2009; CÉSAR FILHO, 2000; ZAPPELINI, 2009).

De acordo com ALVES (1998) e COUTINHO (2009), *D. saccharalis* é suscetível aos fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*, sendo que esse fungo ocorre naturalmente em cerca de 10% das lagartas nas condições do Nordeste. Estes fungos são patogênicos para todos os estágios de desenvolvimento da broca, atuando com eficiência em ovos com um a dois dias de idade. Em experimentos realizados em condições de campo, foi constatada a infecção de 58% de lagartas por *M. anisopliae* e 44% por *B. bassiana*, com dosagem de 10^{13} conídios ha⁻¹.

Em ensaios de laboratório, WENZEL et al. (2006) constataram que o fungo *B. bassiana* foi patogênico para lagartas da broca da cana-de-açúcar em todas as concentrações avaliadas, sendo que a mortalidade aumentou com o tempo e com as concentrações. Resultados apresentados por FOLEGATTI (1985) mostraram que a aplicação conjunta de *M. anisopliae* e *C. flavipes* gera mais mortalidade que a aplicação do fungo isoladamente e não há interferência, ou

seja, o fungo não se mostrou patogênico aos diferentes estágios de desenvolvimento da vespinha, porém não foram feitos ensaios em campo. Logo, o fungo *M. anisopliae* merece ser estudado como mais um agente de biocontrole da broca da cana-de-açúcar, vindo a incrementar o manejo integrado de pragas na cultura da cana-de-açúcar.

IV. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.E.M. & BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.20, p.30-33, 2001.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. **In: Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed., Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 289-381.

ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 77-86, 1992.

ALVES, S.B; RISCO, S.H.; SILVERA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* to *Diatraea saccharalis*. **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, Hamburg, v. 97, p. 403-406, 1984.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. **In: PARRA, J.R.P. et al. Controle biológico no Brasil: predadores e parasitóides**. São Paulo: Manole, 2002, p. 409-425.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; MAGRINI, E.A.; HADDAD, M.L.; RESENDE, L.C.L. Parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) por *Trichogramma galloi* Zucchi em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 141-145, 1995.

BRIDGE, P.D.; ABRAHAM, J.D.; CORNISH, M.C.; PRIOR, C.; MOORE, D. The chemotaxonomy of ***Beauveria bassiana*** (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from coffee berry borer ***Hypothenemus hampei*** (Coleoptera: Scolytidae). **Mycopathologia**, Den Haag, v. 111, n. 2, p. 85-90, 1990.

CÉSAR FILHO, E. **Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para lagartas de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e o efeito de inseticidas sobre esses entomopatógenos.** 2000. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2000.

COUTINHO, H.L.C. **Diversidade microbiana e agricultura sustentável.** BDT – Base de dados Tropical. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/1/heitor.html>> Acesso em: 12 Outubro de 2009.

DE BORTOLI, S.A.; DÓRIA, H. O S.; ALBERGARIA, N.M.M.S.; BOTTI, M.V. Biological aspects and damage of ***Diatraea saccharalis*** (Lepidoptera: Pyralidae) in sorghum, under different doses of nitrogen and potassium. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.2, p. 267-273, 2004.

FOLEGATTI, M.E.G. **Interação entre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., 1883 e os principais parasitóides da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794).** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; 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, 920 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estimativa de produção agrícola 2009**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200906comentarios.pdf>. Acesso em 01 de Junho de 2010.

MANINANIA, N. K.; FARGUES, J. Susceptibility of *Mamestra brassicae* (L.), and *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae (Lep., Noctuidae) to the hyphomycetes *Paecilomyces fumosoroseus* (Brown and Smith) and *Nomuraea riley* (Samson) at two temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 113, p. 518–524, 1992.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTACIMENTO (MAPA). **Sistema Agrofit**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 03 de Dezembro, 2009.

PEREIRA, R.M.; STIMAC, J.L.; ALVES, S.B. Soil antagonism affecting the dose-response of workers of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 61, n. 2 p. 156-161, 1993.

PINTO, A. de S. **Controle de Praga da Cana-de-Açúcar**. Boletim técnico biocontrol n. 1, 2006. 64 p.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). **Dados e cotações – estatísticas**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em 01 de Junho de 2010.

VANDEMBERG, J.D.; SHELTON, A.M.; WILSEY, W.T.; RAMOS, M. Assesment of *Beauveria bassiana* sprays for control the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on crucifers. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 91, p. 624-630, 1998.

WENZEL, I.M.; GIOMETTI, F.H.C.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de ***Beauveria bassiana*** à broca da cana-de-açúcar ***D. saccharalis*** em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.259-261, 2006.

ZAPPELINI, L. O. **Seleção de isolados dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* visando o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) Instituto Biológico, São Paulo, 2009.

CAPÍTULO 2 – APLICAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS EM OVOS E LAGARTAS DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO: A broca da cana *Diatraea saccharalis* é responsável por grandes prejuízos na cultura da cana-de-açúcar. O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa* para ovos e lagartas de *D. saccharalis* por meio da análise de alguns parâmetros biológicos destas fases do ciclo de vida do inseto. Ovos com 24 horas de postura e lagartas de 15 dias foram inoculados com os fungos nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1} . A viabilidade dos ovos foi afetada significativamente no tratamento com 10^8 con. mL^{-1} de *M. anisopliae*, mas as lagartas eclodidas não foram afetadas em nenhum parâmetro avaliado. *M. anisopliae* e *B. bassiana* causaram mortalidade de lagartas principalmente nas concentrações de 10^8 e 10^7 con. mL^{-1} , enquanto a viabilidade pupal e o peso de pupas fêmeas foram significativamente reduzidos apenas pelos tratamentos com 10^8 e 10^7 con. mL^{-1} de *M. anisopliae*, respectivamente. O isolado de *I. farinosa* não se mostrou patogênico para as fases de ovo e lagarta de *D. saccharalis*.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *Diatraea saccharalis*, controle biológico.

CHAPTER 2- APPLICATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ON EGG AND LARVAE STAGES OF SUGARCANE BORER

SUMMARY: The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* is responsible for high losses in sugarcane culture. The aim of this study was to evaluate the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosa* to eggs and larvae of *D. saccharalis* analyzing some biological parameters of these stages of the insect lifecycle. Eggs with 24 hours and larvae with 15 days of life were inoculated with the fungi in the concentrations 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia ml^{-1} . The viability of eggs was significantly affected in 10^8 con. ml^{-1} treatment of *M. anisopliae*, but the larvae weren't affected in none of evaluated parameters. *M. anisopliae* and *B. bassiana* caused larvae mortality mainly in 10^8 e 10^7 con. ml^{-1} concentrations, while the pupae viability and weight of female pupae were significantly reduced only by treatments with 10^8 and 10^7 con. ml^{-1} of *M. anisopliae*, respectively. The strain of *I. farinosa* was not pathogenic to larvae and eggs of *D. saccharalis*.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *Diatraea saccharalis*, biological control.

I. INTRODUÇÃO

A broca da cana-de-açúcar ***Diatraea saccharalis*** é uma das principais pragas da cultura no Brasil, e que devido a sua sazonalidade e alta frequência de ocorrência, gera prejuízos à cultura (PINTO et al., 2006). Os danos provocados podem ser diretos, pela perfuração do colmo, provocando a morte das gemas e reduzindo o fluxo de seiva, além de fragilizar e deixar a planta mais susceptível ao tombamento por chuvas ou ventos. Em plantas mais novas a broca causa a seca dos ponteiros, conhecida como “coração morto”. Danos indiretos ocorrem pela lesão física à planta, criando uma porta de entrada para microrganismos fitopatogênicos, como os fungos ***Colletotrichum falcatum*** e ***Fusarium moniliforme***, causadores da podridão vermelha (GALLO et al., 2002).

Segundo DE BORTOLI et al. (2004), o controle torna-se dificultado, uma vez que a broca penetra no colmo. Medidas tomadas contra lagartas recém-eclodidas abrangem o controle cultural, com o plantio de variedades resistentes, moagem rápida, corte de cana sem desponte, eliminação de plantas hospedeiras, como milho e milheto, após suas colheitas; o controle químico, próximo ao conjunto de folhas centrais da planta, com ingredientes ativos como o triflumuron, lufenuron ou fipronil; e o controle biológico GALLO et al. (2002),.

O controle biológico é realizado com o parasitóide larval ***Cotesia flavipes*** (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae), que possui grande utilização devido às facilidades da produção massal em laboratórios de criação e a sua capacidade de localização da praga (BOTELHO & MACEDO, 2002). O parasitóide entra no colmo à procura da lagarta, sendo a de terceiro instar a mais susceptível ao parasitismo.

Os fungos entomopatogênicos ***B. bassiana*** e ***M. anisopliae*** são mundialmente conhecidos como agentes biocontroladores de inúmeras pragas agrícolas. Essas espécies apresentam potencial de controle para diversas ordens de insetos, inclusive para lepidópteros pragas como ***Plutella xylostella*** (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), ***Alabama argillacea*** (Hübner, 1818) (Lepidoptera:

Noctuidae) e para a própria ***D. saccharalis***, atuando com eficiência em ovos com um a dois dias de idade (ALVES, 1998), fase do ciclo mais exposta, já que a oviposição ocorre na face superior das folhas da planta e a eclosão das lagartas pode levar até 9 dias (GALLO et al., 2002).

Fungos do gênero ***Isaria*** também são conhecidos como potenciais controladores biológicos, principalmente de lepidópteros (MAKETON et al., 2008). A patogenicidade de ***I. farinosa*** para vários insetos foi relatada por ZIMMERMANN (2008), porém não existem trabalhos direcionados para a broca da cana.

Além da mortalidade, fungos entomopatogênicos podem agir sobre aspectos biológicos dos insetos como oviposição, fecundidade, viabilidade de ovos, lagartas e pupas, essenciais para a manutenção do ciclo de vida da praga no campo (EKESI & MANIANIA, 2000; MULOCK & CHANDLER, 2001).

A maior parte dos estudos sobre a patogenicidade de fungos para ***D. saccharalis*** foi realizada usando apenas o estágio de lagarta, mas de acordo com ALVES (1998), a susceptibilidade do inseto pode variar em função de suas diferentes fases de desenvolvimento. Contudo, não existem estudos que investigaram os efeitos da aplicação de fungos entomopatogênicos nas diversas fases de vida de ***D. saccharalis***.

II. OBJETIVOS

Este estudo foi conduzido com o objetivo de verificar a patogenicidade de ***M. anisopliae***, ***B. bassiana*** e ***I. farinosa*** para ovos e lagartas de ***D. saccharalis*** por meio da análise de alguns parâmetros biológicos destas fases do ciclo de vida do inseto.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos

Os ovos de *D. saccharalis* foram fornecidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) de Piracicaba, SP. As lagartas foram fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da Usina Santa Adélia, Jaboticabal, SP.

3.2. Fungos

Foram utilizados os fungos *M. anisopliae*, isolado E9, *B. bassiana*, isolado JAB 06, e *I. farinosa*, isolado CG 189, mantidos em culturas estoque no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Os fungos foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura de batata-dextrose-água (BDA). Incubou-se durante 14 dias em estufa tipo BOD a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e após esse período foram preparadas suspensões conidiais em solução de Tween 80[®] a 0,1% (v v⁻¹), nas concentrações 10^8 , 10^7 e 10^6 con. mL⁻¹. Foram realizados testes de viabilidade de acordo com a metodologia de FRANCISCO et al. (2006). Só foram utilizados para inoculação nos insetos quando a viabilidade dos conídios foi maior que 90%.

3.3. Bioensaio com massas de ovos de *D. saccharalis*

Para cada espécie fúngica, foi realizado um bioensaio, sendo que cada concentração de cada isolado fúngico representou um tratamento, além da testemunha, com cinco repetições contendo dez massas de ovos cada.

Massas de ovos de *D. saccharalis* postas em folhas de papel sulfite durante o período de 24 horas foram contadas em microscópio estereoscópico; utilizaram-se massas que contivessem entre 10 e 30 ovos. Foram separados grupos de 10

massas de ovos e em seguida colocados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, revestidas em sua base com papel de filtro para auxiliar na secagem. Posteriormente, foram pulverizadas com auxílio de aspersor manual, 1 mL da suspensão dos conídios, nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 con. mL^{-1} , e em seguida, incubou-se as placas em estufa tipo BOD a $25 \pm 0,5$ °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante três dias. Em cada placa com as massas de ovos foi introduzido papel de filtro umedecido. Utilizou-se 50 massas de ovos para cada tratamento. O grupo testemunha foi pulverizado com o veículo das suspensões dos conídios. No quarto dia pós-pulverização, cada massa de ovo foi transferida para tubos contendo dieta artificial modificada de HENSLEY & HAMMOND JR. (1968), que consiste basicamente de solução vitamínica, sais de Wesson, açúcar, farelo de soja, germe de trigo, ácido ascórbico e água.

A avaliação foi feita observando diariamente a eclosão das lagartas. Massas que apresentaram extrusão (Figura 1) do fungo foram colocadas em câmara úmida e mantidas em estufa tipo BOD a $25 \pm 0,5$ °C, com fotoperíodo de 12 horas, para confirmar a mortalidade do embrião pelo fungo. Após a eclosão, as lagartas foram mantidas por 15 dias em tubos com dieta e após esse período, foram alocadas em caixas entomológicas de polipropileno (60 x 20 mm), com um cubo de dieta de 2 cm^3 . Foram colocadas cinco lagartas por caixa entomológica. Avaliou-se o tempo de vida, a mortalidade e a viabilidade das lagartas. As caixas entomológicas foram mantidas em BOD a $25 \pm 0,5$ °C, com fotoperíodo de 12 horas, até que todas as lagartas atingissem à fase de pupa.

3.4. Bioensaio com lagartas de *D. saccharalis*

Grupos de 50 lagartas de terceiro ínstar (15 dias de vida) foram imersos por 1 minuto em 20 mL de suspensão dos fungos, nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 con. mL^{-1} . O grupo testemunha foi imerso no veículo da suspensão dos conídios. Após a inoculação, foram individualizadas e mantidas em caixas entomológicas. As caixas foram mantidas em estufa tipo BOD $25 \pm 0,5$ °C, com

fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas da inoculação, foi oferecido um cubo de dieta de 2 cm³ por lagarta. Avaliou-se o tempo de vida e a mortalidade. As lagartas mortas foram colocadas em câmara úmida para confirmação da mortalidade pela extrusão (Figura 1) do fungo. As lagartas que empuparam, tiveram seu peso aferido e foram separadas em macho ou fêmea em microscópio estereoscópico. Retirou-se a dieta e um chumaço de algodão umedecido com água destilada foi colocado na placa entomológica. Diariamente foi avaliada a emergência de adultos.

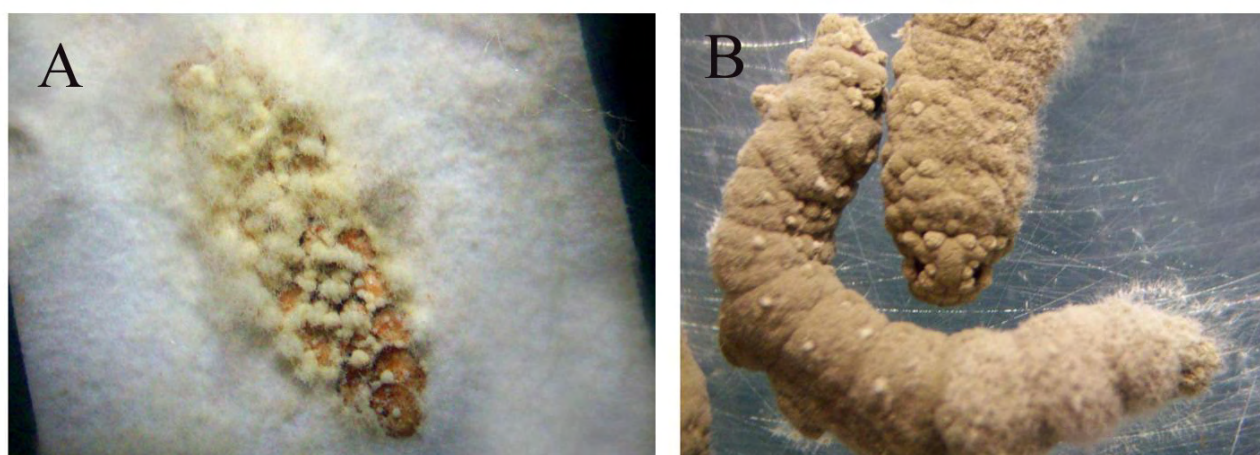


Figura 1. Ovos (A) e lagartas (B) de *Diatraea saccharalis* apresentando extrusão do fungo *Metarhizium anisopliae*.

3.5. Delineamento experimental e análise estatística

Os ensaios foram organizados segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com grupos de 10 insetos por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para viabilidade de ovos e mortalidade de lagartas a análise foi feita seguindo um esquema fatorial com dois fatores x testemunha, sendo os isolados do fungo o primeiro fator e a concentração de conídios o segundo fator. Para execução das análises, utilizou-se o programa ESTAT (1997).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bioensaios com massas de ovos de *D. saccharalis*

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) no número de lagartas eclodidas de ovos pulverizados com *B. bassiana* e com *I. farinosa* em relação à testemunha, considerando-se as concentrações de conídios avaliadas (Tabela 1). Ocorreram reduções expressivas nos resultados obtidos para viabilidade de ovos tratados com *B. bassiana*, nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 con. mL⁻¹, e para *I. farinosa* nas concentrações de 10^7 e 10^8 con. mL⁻¹, porém estatisticamente não foi detectada diferença entre esses tratamentos e a testemunha. O único fungo que teve efeito sobre ovos foi o isolado E9 de *M. anisopliae* que, na concentração de 10^8 con. mL⁻¹, diminuiu para 8,2% a eclosão das lagartas, diferindo da testemunha (Tabela 1).

O período embrionário dos ovos tratados com os três fungos não diferiu significativamente do ocorrido na testemunha, que foi de 6,6 dias (Tabela 1), resultados congruentes com os encontrados na literatura, pois segundo GALLO et al. (2002), o período embrionário de ovos de *D. saccharalis* varia entre 4 e 9 dias.

O período larval e a viabilidade das lagartas eclodidas dos ovos pulverizados não foram afetados por nenhum isolado em nenhuma concentração de conídio avaliada, pois não diferiram da testemunha ($p>0,05$), como mostra a Tabela 1.

A ação destes entomopatógenos sobre ovos de lepidópteros pode ter sua eficiência comprometida, já que por levar alguns dias, é dificultada tanto pela proteção proporcionada pelo córion do ovo, como também devida a rápida eclosão das lagartas. Somente *M. anisopliae* se mostrou eficiente no controle dos ovos, penetrando e causando a morte do embrião. *B. bassiana* e *I. farinosa* não se mostraram tão virulentos, sendo capazes de colonizar o córion do ovo, como foi observado neste experimento, porém sem atingir o embrião, permitindo a eclosão da larva.

Tabela 1 - Viabilidade e período de incubação de ovos de *Diatraea saccharalis* tratados com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*, e os efeitos desses fungos no período e viabilidade das lagartas eclodidas.

Tratamento	Concentração (con. mL ⁻¹)	Viabilidade dos ovos (%) ¹	Período de eclosão (dias)	Período larval (dias)	Viabilidade de lagartas (%)
Testemunha		86,23 a	6,6 a	24,3 a	99,6 a
	1,0 x 10 ⁸	8,2 Bb	6,3 a	25,4 a	85,6 a
<i>M. anisopliae</i>	1,0 x 10 ⁷	57,6 Aa	6,6 a	28,3 a	72,2 a
	1,0 x 10 ⁶	63,2 Aa	6,4 a	26,0 a	89,9 a
	1,0 x 10 ⁸	66,3 Aa	6,4 a	25,5 a	82,5 a
<i>B. bassiana</i>	1,0 x 10 ⁷	41,9 Aab	6,7 a	26,5 a	80,7 a
	1,0 x 10 ⁶	31,7 Aab	6,7 a	26,1 a	79,8 a
	1,0 x 10 ⁸	44,7 Aab	6,7 a	28,1 a	89,5 a
<i>I. farinosa</i>	1,0 x 10 ⁷	36,6 Aab	6,4 a	27,0 a	84,5 a
	1,0 x 10 ⁶	68,0 Aa	6,4 a	27,1 a	87,0 a
Teste F		3,44**	0,47 ^{ns}	1,03 ^{ns}	1,38 ^{ns}
CV (%)		21,78	7,91	13,44	21,76

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (p<0,05).

¹Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em Log x + 10.

Letras minúsculas referem-se à comparação de médias confrontando todos os tratamentos entre si

Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias das concentrações dentro de cada fungo.

**Significativo a 1% de probabilidade. ^{ns}Não significativo.

Os resultados obtidos por RODRÍGUES et al. (2006), que avaliaram a patogenicidade de 70 isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, mostram que somente três causaram mortalidade de ovos de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) maior que 60%. No atual experimento, as mortalidades variaram de 68 a 91,8%, com os mesmos fungos entomopatogênicos.

A duração do período larval verificada neste trabalho foi semelhante à encontrada por OLIVEIRA et al. (2008) ao tratarem lagartas com 1,0 x 10³, 1,0 x

10^4 e $1,0 \times 10^5$ con. mL^{-1} de ***B. bassiana*** (24,6, 25,5 e 26,30 dias, respectivamente), mas foi menor que a encontrada pelos autores para ***M. anisopliae*** (33,9, 34,4 e 34,9 dias, respectivamente).

O isolado de ***I. farinosa*** não se mostrou patogênico para ovos e lagartas da broca da cana, e não há relatos de trabalhos com fungos do gênero ***Isaria***. Porém, em relação a outros lepidópteros, há vários estudos descritos na literatura. HUMBER & HANSEN (2005) descreveram a susceptibilidade de amplo número de famílias de lepidópteros. ZIMMERMANN (2008) ressaltou o potencial deste gênero como controlador de lepidópteros praga, e o grande número de epizootias naturais do entomopatógeno. Há relatos da ocorrência natural de ***Isaria*** sp. em lagartas de ***D. saccharalis*** (DE ROMERO et al., 2008), porém nas concentrações utilizadas neste trabalho, não foi observada atividade patogênica para ovos e lagartas da broca da cana.

4.2. Bioensaios com lagartas de ***D. saccharalis***

M. anisopliae e ***B. bassiana*** se mostraram patogênicos e os melhores resultados ocorreram na concentração de 10^8 con. mL^{-1} que promoveu, respectivamente, 98 e 78% de morte de lagartas. A mortalidade ocasionada por ***M. anisopliae*** diferiu da testemunha em todas as concentrações de conídios e para ***B. bassiana*** diferiu nas concentrações de 10^8 e 10^7 con. mL^{-1} . O isolado de ***I. farinosa*** não se mostrou patogênico para lagartas (Tabela 2).

O período larval e a viabilidade das lagartas sobreviventes dos ovos inoculados não foram afetados, e nenhum tratamento diferiu significativamente da testemunha, podendo inferir que estes parâmetros não foram influenciados pela ação dos fungos.

Tabela 2. Mortalidade, período e viabilidade de lagartas de *Diatraea saccharalis* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*, e seus efeitos sobre as pupas formadas.

Tratamento	Concentração (con. mL ⁻¹)	Mortalidade (%)	Período larval (dias)	Viabilidade larval (%)	Peso de pupas fêmeas (g)	Viabilidade pupal (%) ¹
Testemunha		2,0 e	24,5 a	96,0 a	0,19681 a	96,0 a
	1,0 x 10 ⁸	98,0 Aa	26,3 a	100,0 a	-	0,0 b
<i>M. anisopliae</i>	1,0 x 10 ⁷	74,0 Bab	23,6 a	95,0 a	0,14587 b	80,0 a
	1,0 x 10 ⁶	42,0 Ccd	24,9 a	97,5 a	0,1833 ab	91,0 a
	1,0 x 10 ⁸	78,0 Aab	24,5 a	100,0 a	0,1955 a	92,0 a
<i>B. bassiana</i>	1,0 x 10 ⁷	58,0 Bbc	24,2 a	96,0 a	0,1685 ab	92,0 a
	1,0 x 10 ⁶	16,0 Cde	24,7 a	100,0 a	0,1857 ab	85,7 a
	1,0 x 10 ⁸	2,0 Ae	25,0 a	100,0 a	0,1951 a	97,8 a
<i>I. farinosa</i>	1,0 x 10 ⁷	8,0 Ae	26,0 a	100,0 a	0,1836 ab	97,8 a
	1,0 x 10 ⁶	0,0 Ae	26,7 a	100,0 a	0,1844 ab	96,0 a
Teste F		42,82**	1,67 ^{ns}	0,64 ^{ns}	2,64*	13,31**
CV (%)		33,46	6,63	5,86	12,11	8,10

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% (p<0,05).

Valores ausentes referem-se a ausência de fêmeas nas lagartas sobreviventes ao fungo.

¹Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em Log x + 10.

Letras minúsculas referem-se à comparação de médias confrontando todos os tratamentos entre si.

Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias das concentrações dentro de cada fungo.

**Significativo a 1% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo

O peso de pupas fêmeas tratadas com ***M. anisopliae*** na concentração de 1,0 x 10⁷ con. mL⁻¹ (0,1459 g) foi o único que diferiu da testemunha (0,1968g), mostrando que praticamente não houve influência dos fungos no peso de pupas fêmeas (Tabela 2). Não foi analisado o peso de pupas fêmeas tratadas com 1,0 x 10⁸ con. mL⁻¹ de ***M. anisopliae***, pela quase ausência de fêmeas no grupo, devido a grande mortalidade de lagartas (98%).

A viabilidade de pupas machos e fêmeas foi afetada somente no tratamento com 10^8 con. mL^{-1} de *M. anisopliae*. As pupas provenientes de lagartas tratadas nessa concentração do fungo não deram origem a nenhum adulto. Nos demais tratamentos, a aplicação de 10^7 con. mL^{-1} de *M. anisopliae* causou a menor viabilidade de pupas (80%), seguido pelo tratamento com *B. bassiana* na concentração 10^6 con. mL^{-1} (85,7%). No grupo testemunha obteve-se 96% de viabilidade de pupas (Tabela 2).

Resultados semelhantes são encontrados na literatura, como os obtidos por ACEVEDO et al. (2007), que inocularam lagartas de *D. saccharalis* com dois isolados de *M. anisopliae* na concentração de $1,0 \times 10^8$ con. mL^{-1} e obtiveram mortalidades de 60 e 100%, após 9 dias de avaliação. WENZEL et al. (2006) avaliaram por seis dias a mortalidade de lagartas de broca da cana, inoculadas com *B. bassiana* nas concentrações de $5,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $5,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$ e $5,0 \times 10^8$ con. mL^{-1} , obtendo mortalidades de 32, 41, 65, 85 e 89%, respectivamente, enquanto na testemunha a mortalidade foi de 15%.

Existem poucos relatos na literatura sobre a ação de *I. farinosa* para *D. saccharalis*, mas existem trabalhos que comprovam sua patogenicidade para lagartas de lepidópteros, como *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) (PEDLAND et al., 1995) e *Acraga moorei* (Dyar, 1898) (Lepidoptera: Dalceridae) em campo (LOURENÇÃO & SABINO, 1994). A resistência aos fungos entomopatogênicos está relacionada com o melanismo da cutícula da lagarta e com as defesas da hemolinfa, porém, usando-se uma grande concentração de conídios do entomopatógeno, estes são capazes de penetrar a cutícula e causar a morte em um curto período de tempo (WILSON et al., 2001).

De acordo com OLIVEIRA et al. (2008), *M. anisopliae* e *B. bassiana* inoculados em lagartas de terceiro ínstar de *D. saccharalis*, nas concentrações de $1,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^5$ con. mL^{-1} , pouco afetaram a viabilidade larval que foi de 86,7, 86,7 e 56,7%, e 86,7, 76,7 e 56,7%, respectivamente, enquanto a testemunha apresentou 86,7% de lagartas viáveis. No mesmo experimento, a viabilidade pupal foi de 88,3, 73,3 e 65,3% nos tratamentos com *M. anisopliae* e 76,7, 75,3 e 60,0% nos tratamentos com *B. bassiana*, sendo que 84,3% das pupas

do grupo testemunha foram viáveis. Os resultados de nosso experimento são semelhantes aos desses autores, mas foram obtidos usando maiores concentrações de conídios que causaram maior mortalidade de pupas.

O tratamento com $1,0 \times 10^7$ con. mL^{-1} de ***M. anisopliae*** reduziu significativamente o peso das pupas, que pode ter ocorrido pela redução do consumo de alimento pela lagarta. Existem relatos semelhantes na literatura, onde ***M. anisopliae*** e ***B. bassiana*** reduziram o consumo de alimento de lagartas de ***Chilo parteullus*** (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Pyralidae) em dieta artificial (TEFERA & PRINGLE, 2003), e também avaliações em campo, onde o consumo de milho por ***C. partellus*** foi significativamente menor que a testemunha (TEFERA & PRINGLE, 2004).

V. CONCLUSÃO

O isolado de ***M. anisopliae*** é patogênico para ovos e lagartas de ***D. saccharalis*** e sua ação diminui o peso e a viabilidade das pupas provenientes de lagartas tratadas. O isolado de ***B. bassiana*** é patogênico para lagartas de ***D. saccharalis***, porém não influenciou nenhum dos outros parâmetros das fases de ovo e lagartas avaliados. O isolado de ***I. farinosa*** não é patogênico para ovos e lagartas ***D. saccharalis*** e sua ação não interfere no ciclo de vida da praga.

VI. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, n. 2, p. 187-192, 2007.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. **In: Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed., Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 289-381.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. **In: PARRA, J.R.P. et al. Controle biológico no Brasil: predadores e parasitóides**. São Paulo: Manole, 2002, p. 409-425.

DE BORTOLI, S.A.; DÓRIA, H. O S.; ALBERGARIA, N.M.M.S.; BOTTI, M.V. Biological aspects and damage of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in sorghum, under different doses of nitrogen and potassium. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 267-273, 2004.

DE ROMERO, M.G.Y.; SALVATORE, A.R.; LÓPEZ, G.; WILLINK, E. Presencia natural de hongos hyphomycetes em larvas invernantes de *Diatraea saccharalis* F. en caña de azúcar em Tucumán, Argentina. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, Tucumán, v. 85, n. 2, p. 32-42, 2008.

EKESI, S.; MANIANIA, N.K. Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrencht, v. 94, n. 3, p. 229-236, 2000.

ESTAT – **Sistema para análises estatísticas**, V. 2.0 (livre), 1997, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Departamento de

Ciências Exatas. Disponível em:
<<http://www.fcav.unesp.br/download2/softwares/estat/>>

FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A.C.B.; MONTEIRO, A.C.M.. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1309-1312, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; 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, 920 p.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND JR., A.H. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 61, p.1742-1743, 1968.

HUMBER, R.A.; HANSEN, K.S. 'USDA-ARS Collection of entomopathogenic fungal cultures (ARSEF), **ARSEF-Catalog: Host by Fungus**. Disponível em: <<http://arsef.fpsnl.cornell.edu>>. Acesso em 20 setembro de 2009.

LOURENÇÃO, A.L.; SABINO, J.C. **Acraga moorei** Dyar (Lepidoptera: Dalceridae) em macadâmia no estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 54, n. 2, p. 185-190, 1994.

MAKETON, M. OROSZ-COGLAN, P.; JAEGERUN, J. Field Evaluation of **Isaria fumosorosea** in Controlling the Diamondback Moth (**Plutella xylostella**) in Chinese Kale. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 36, n. 3, p. 260-263, 2008.

MULOCK, B.S.; CHANDLER, L.D. Effect of **Beauveria bassiana** on the fecundity of western corn rootworm, **Diabrotica virgifera virgifera** (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biological Control**, London, v. 22, p. 16-21, 2001.

OLIVEIRA, M. A. P.; MARQUES, E. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; BARROS, R. Efeito de **Beauveria bassiana** (Bals.) Vuill. e **Metarhizium anisopliae** (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de **Diatraea saccharalis** F. (Lepidoptera:

Crambidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

PEDLAND, J.C.; HUNG, S.; BOUCIAS, D. In vivo development of the entomogeneous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* (beet armyworm) larvae. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 130, n.3, p.151-158, 1995.

PINTO, A. de S. **Controle de Praga da Cana-de-Açúcar**. Boletim técnico biocontrol, n. 1, 2006. 64 p.

RODRÍGUEZ -S., M.; GERDING-P., M.; FRANCE-I., A. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: gelechiidae). **Agricultura Técnica**, Santiago Del Chile, v. 66, n. 2, p. 151-158, 2006.

TEFERA, T.; PRINGLE, K.L. Mortality and maize leaf consumption of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae treated with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **International Journal of Pest Management**, London, v. 50, n. 1, p. 29-34, 2004.

TEFERA, T.; PRINGLE, K.L. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 84, n. 3, p. 220-225, 2003.

WENZEL, I.M.; GIOMETTI, F.H.C.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis* em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.259-261, 2006.

WILSON, K; COTTER, AC; REESON, AF; PELL, JK. Melanism and disease resistance in insects. **Ecology Letters**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 637-649, 2001.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 865-901, 2008.

CAPÍTULO 3 – EFEITOS CAUSADOS PELA APLICAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NAS FASES DE PUPA E ADULTO DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO: O controle da broca da cana tem como alvo principal somente a fase de lagarta. No entanto, a eficiência pode ser maior atingindo fases do ciclo da praga mais expostas aos agentes de controle. O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de pupas e adultos de *Diatraea saccharalis* aos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa* e avaliar seus efeitos no ciclo de vida da praga. Pupas recém formadas e adultos com 24 horas de vida foram inoculados com os fungos nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 con. mL⁻¹ e analisados diversos parâmetros biológicos do inseto. O tratamento com 10^8 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae* e *B. bassiana* produziu significativa mortalidade de pupas, afetando também a viabilidade de pupas e a longevidade de adultos. A fecundidade foi severamente afetada por *I. farinosa* na concentração 10^8 con. mL⁻¹ e pelos outros fungos em todas as concentrações avaliadas. Verificou-se grande mortalidade de adultos tratados com todas as concentrações de *M. anisopliae* e com 10^7 con. mL⁻¹ de *B. bassiana*. A longevidade e a fecundidade não foram afetadas pelos fungos, e a viabilidade dos ovos foi significativamente reduzida pelo tratamento com 10^6 e 10^8 con. mL⁻¹ de *B. bassiana*.

Palavras-chave: *Diatraea saccharalis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa*, controle biológico.

CHAPTER 3 – EFFECTS CAUSED BY ENTOMOPATHOGENIC FUNGI APPLICATION ON PUPAE AND ADULT PHASES OF SUGARCANE BORER

SUMMARY: The mainly target of sugarcane borer control is only for the larvae. However, the efficiency can be higher reaching the lifecycle stages of the pest with more exposure to agents control. The aim of this study was to evaluate the susceptibility of pupae and adults of *Diatraea saccharalis* to the fungi *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosa* and to evaluate their effects in pest lifecycle. Newly formed pupae and adults with 24 hours of life were inoculated with conidial fungi suspensions containing 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia ml^{-1} and analyzed several biological parameters of the insect. The treatment with 10^8 con. ml^{-1} of *M. anisopliae* and *B. bassiana* produced significant pupae mortality, also affecting the pupae viability and adults longevity. The fecundity was severely affected by *I. farinosa* with 10^8 con. ml^{-1} concentration and by other fungi in all the evaluated concentrations. There was high mortality of treated adults with all concentrations of *M. anisopliae* and with 10^7 con. ml^{-1} of *B. bassiana*. The longevity and fecundity were not affect by fungi, and the eggs viability was significantly reduced by treatment with 10^6 and 10^8 con. ml^{-1} of *B. bassiana*.

Key words: *Diatraea saccharalis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa*, biological control.

I. INTRODUÇÃO

Por sua sazonalidade e ocorrência, a broca da cana-de-açúcar ***D. saccharalis*** é considerada praga primária e responsável por grandes perdas na cultura. Os prejuízos são causados pela abertura física das galerias e por microrganismos oportunistas que invadem a planta pela porta de entrada aberta pelas lagartas. O uso de inseticidas químicos, o controle cultural e o biológico são as principais estratégias de combate (GALLO et al., 2002). O controle biológico através da vespa ***C. flavipes***, que parasita as lagartas, é o mais utilizado (BOTELHO & MACEDO, 2002).

Porém, segundo DE BORTOLI et al. (2004), métodos de controle da lagarta são de difícil sucesso devido ao seu hábito de penetrar no colmo logo após a primeira mudança de ínstar. O uso de fungos entomopatogênicos pode complementar o controle, agindo sobre outras fases do ciclo de vida do inseto, mitigando o grande potencial reprodutivo da praga.

A grande maioria dos trabalhos já realizados visou somente a fase de lagarta de ***D. saccharalis***. No entanto, a susceptibilidade do inseto pode variar de acordo com a fase de desenvolvimento (ALVES, 1998), e segundo WEKESA et al. (2007) além de provocar mortalidade, os fungos entomopatogênicos também podem interferir no desenvolvimento do ciclo de vida do inseto, afetando a fecundidade e a viabilidade de ovos.

A pupa de vários lepidópteros é susceptível aos fungos ***M. anisopliae*** (ANAND et al., 2009), ***B. bassiana*** (HICKS et al., 2001), e ***Isaria fumosorosea*** Wize (NGUYEN et al., 2007), que se mostrou eficiente em campo no controle de ***Argyresthia conjugellale*** (Zeller, 1839) (Lepidoptera: Yponomeutidae) (VÄNNINEN & HOKKANEN, 1997). Apesar de não serem comuns trabalhos avaliando a patogenicidade de fungos para adultos de ***D. saccharalis***, ALMEIDA (2009) mostrou a alta susceptibilidade de adultos de ***Plutella xylostella*** (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos ***M. anisopliae***, ***B. bassiana*** e ***I. farinosa***.

Fungos do gênero *Isaria* sp. são patogênicos à vários lepidópteros, como *Ectropis bistortata* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Geometridae) e *Caloptilia syringella* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Glacillariidae) (KLEESPIES et al., 2008) e esse fungo é conhecido por causar doença em populações naturais de lepidópteros (ZIMMERMANN, 2008), porém não existem trabalhos direcionados para o controle da broca da cana.

II. OBJETIVO

Este estudo foi conduzido com o objetivo de verificar a susceptibilidade dos estágios de pupa e adulto de *D. saccharalis* a ação dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. farinosa*, avaliando diversos parâmetros biológicos destas fases do ciclo de vida do inseto.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos

As pupas de *D. saccharalis* foram fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da Usina Santa Adélia, Jaboticabal, SP, e os adultos pelo Centro de Tecnologia Canaveieira (CTC) de Piracicaba, SP.

3.2. Fungos

Foram utilizados o isolado E9 de *M. anisopliae*, JAB 06 de *B. bassiana*, e CG 189 de *I. farinosa*, mantidos em culturas estoque no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. Os fungos foram cultivados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) por 14 dias a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e após esse período foram preparadas suspensões conidiais em solução de Tween 80[®] a 0,1% (v v⁻¹), nas concentrações 10^8 , 10^7 e 10^6 con. mL⁻¹. Foram realizados testes de

viabilidade segundo a metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2006). Para cada fungo foram feitas três repetições, e só foram utilizados para inoculação nos insetos quando a viabilidade dos seus conídios foi maior que 90%.

3.3. Bioensaio com pupas de *D. saccharalis*

Pupas recém formadas foram separadas em macho e fêmea pela observação em microscópio estereoscópico e banhadas por 1 minuto em 20 mL das suspensões de conídios. Pupas da testemunha foram banhadas no veículo da suspensão dos conídios. Posteriormente, foram transferidas para câmaras úmidas contendo papel de filtro e algodão umedecido e incubadas a $25 \pm 0,5$ °C com fotoperíodo de 12 horas. Após a emergência de adultos, casais foram transferidos para gaiolas feitas de tubos de policloreto de vinila (PVC) de 85 mm de diâmetro e 110 mm de altura, revestidas internamente com folha de papel sulfite para oviposição das fêmeas (Figura 2). A base da gaiola consistiu de um fundo de uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro recoberta com papel de filtro. A extremidade superior foi fechada com tecido **voile** preso com elásticos de látex. Uma placa de Petri de 55 mm de diâmetro com algodão umedecido em mel a 10% oferecido como dieta foi colocada na base da gaiola. As gaiolas foram mantidas em estufa a $25 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 horas.



Figura 2. Gaiola de PVC usada para acondicionar adultos de *Diatraea saccharalis*.

Avaliou-se a mortalidade confirmada, o período e a viabilidade pupal, a longevidade dos adultos emergidos e a fecundidade das fêmeas sobreviventes. A viabilidade das pupas foi avaliada pela observação diária da emergência de adultos. Pupas que não originaram adultos foram mantidas em câmaras úmidas para confirmar a mortalidade pela extrusão do fungo (figura 3). As folhas de papel sulfite foram substituídas diariamente, e após a retirada, foram mantidas a $25 \pm 0,5$ °C por três dias. Depois desse período, contou-se, com o auxílio de microscópio estereoscópico, os ovos das massas para determinar a fecundidade das fêmeas.

3.4. Bioensaio com adultos de *D. saccharalis*

Grupos de 25 machos e 25 fêmeas recém emergidos (cerca de 12 horas de vida) foram pulverizados com 1 mL das suspensões de conídios, a uma distância de 10 cm, usando aspersor manual. O grupo testemunha foi pulverizado com o veículo das suspensões. Em gaiolas idênticas as do ensaio anterior, mantidas a $25 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 horas, foram colocados cinco casais.

Avaliou-se a mortalidade confirmada, a longevidade de adultos machos e fêmeas, a fecundidade das fêmeas e a viabilidade dos ovos. Os adultos mortos foram transferidos para câmaras úmidas para confirmação da mortalidade pela extrusão fungo (Figura 3). As folhas de sulfite com as posturas foram retiradas diariamente, e após três dias os ovos foram contados e numerados, e voltaram a ser incubados. Depois da ocorrência da eclosão das lagartas, os ovos das mesmas folhas foram contados novamente para avaliar a viabilidade.

3.5. Delineamento experimental e análise estatística

Os ensaios foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com grupos de 10 insetos por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Somente para mortalidade confirmadas de pupas e adultos foi feita análise seguindo um esquema fatorial com dois fatores x testemunha, sendo os isolados do fungo o

primeiro fator e a concentração de conídios o segundo fator. Para execução das análises, utilizou-se o programa ESTAT (1997).

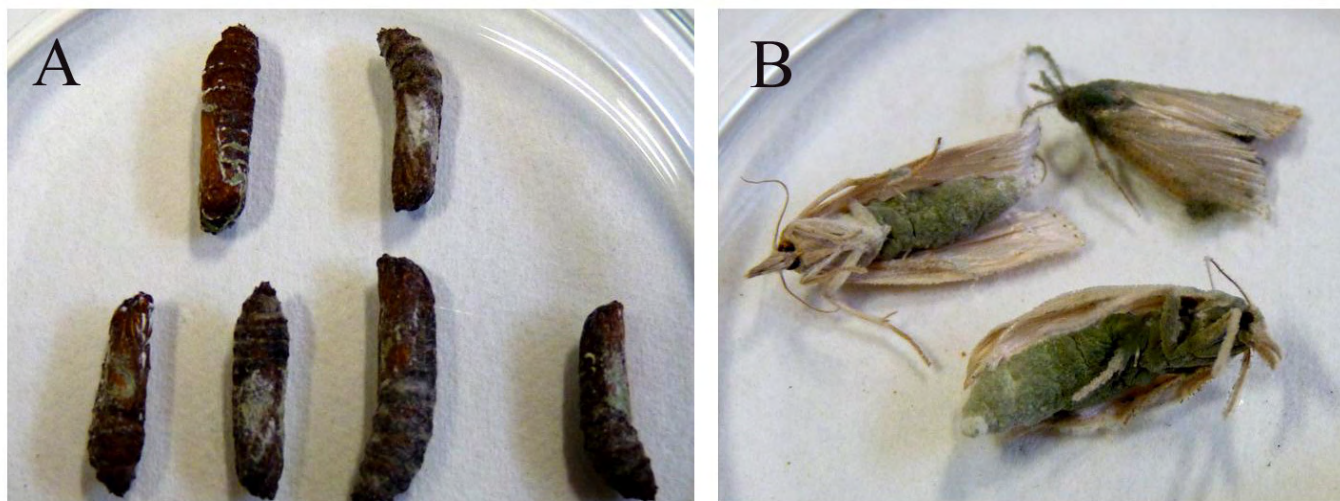


Figura 3. Pupas (A) e adultos (B) de *Diatraea saccharalis* apresentando extrusão do fungo *Metarhizium anisopliae*.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bioensaios com pupas de *D. saccharalis*

A mortalidade confirmada de pupas tratadas com *M. anisopliae*, nas concentrações de 10^8 e 10^7 con. mL⁻¹, e com *B. bassiana* na concentração de 10^8 con. mL⁻¹ diferiu significativamente da encontrada na testemunha (Tabela 3), evidenciando a ação patogênica dos fungos.

A viabilidade das pupas fêmeas tratadas também diferiu da testemunha, com destaque para as menores viabilidades com a aplicação de 10^8 con. mL⁻¹ de *B. bassiana* (12%) e de *M. anisopliae* (14%), enquanto o controle apresentou uma viabilidade de fêmeas de 46% (Tabela 3). Observou-se resultado semelhante nas pupas machos tratadas com 10^8 e 10^7 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae*, que apresentaram viabilidades de 8 e 10% respectivamente. No tratamento com *B. bassiana*, apesar de ter ocorrido uma considerável redução, não foram

encontradas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) (Tabela 3). Não foi observada ação de *I. farinosa* na mortalidade confirmada e viabilidade de pupas machos e fêmeas (Tabela 3).

O período pupal de machos e fêmeas não foi afetado pelos entomopatógenos e mostrou resultados que não diferiram do controle, exceto por um pequeno aumento em relação à testemunha, observado na concentração de 10^8 con. mL⁻¹ de *B. bassiana* (Tabela 3). Porém, segundo GALLO et al. (2002), o período pupal pode durar até 14 dias, e assim o valor encontrado (10,35 dias) está dentro da normalidade.

Tabela 3. Mortalidade, período pupal e viabilidade de pupas de *Diatraea saccharalis* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*.

Tratamento	Concentração (con. mL ⁻¹)	Mortalidade confirmada (%) ¹	Período pupal (dias)		Viabilidade (%) ¹	
			Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Testemunha		0,0 b	8,38 ab	8,46 bc	46,0 a	50,0 a
	$1,0 \times 10^8$	52,0 Aa	8,60 ab	9,00 abc	14,0 b	8,0 b
<i>M. anisopliae</i>	$1,0 \times 10^7$	40,0 Aa	8,50 ab	8,00 c	16,0 ab	10,0 b
	$1,0 \times 10^6$	12,0 Bb	8,00 bc	8,37 bc	12,0 ab	34,0 ab
	$1,0 \times 10^8$	42,0 Aa	8,75 ab	10,35 a	12,0 b	20,0 ab
<i>B. bassiana</i>	$1,0 \times 10^7$	8,0 Bb	8,75 ab	8,50 bc	24,0 ab	30,0 ab
	$1,0 \times 10^6$	8,0 Bb	8,88 ab	8,75 abc	16,0 ab	24,0 ab
	$1,0 \times 10^8$	4,0 Ab	9,68 a	8,20 c	46,0 ab	38,0 ab
<i>I. farinosa</i>	$1,0 \times 10^7$	2,0 Ab	9,23 ab	8,95 abc	30,0 ab	38,0 ab
	$1,0 \times 10^6$	0,0 Ab	9,63 a	9,72 abc	46,0 ab	48,0 a
Teste F		17,89**	2,99*	4,39**	3,77**	4,24**
CV (%)		12,09	7,45	7,63	14,69	13,87

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

¹Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em $\text{Log } x + 10$.

Letras minúsculas referem-se à comparação de médias confrontando todos os tratamentos entre si.

Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias das concentrações dentro de cada fungo.

**Significativo a 1% de probabilidade.

A longevidade de machos e fêmeas emergidos das pupas tratadas foi diminuída significativamente com *M. anisopliae* nas doses de 10^8 e 10^7 con. mL⁻¹, enquanto *B. bassiana* reduziu apenas a viabilidade dos machos nas concentrações de 10^8 , 10^7 e 10^6 con. mL⁻¹. O isolado de *I. farinosa* não influenciou na longevidade dos adultos emergidos de pupas tratadas (Tabela 4).

M. anisopliae e *B. bassiana* reduziram drasticamente a fecundidade dos adultos emergidos de pupas tratadas, exceto na concentração de 10^6 con. mL⁻¹ para *B. bassiana*, levando a oviposição a praticamente zero. No tratamento com *I. farinosa* observou-se uma redução significativa da fecundidade na concentração de 10^8 con. mL⁻¹ (Tabela 4).

A fecundidade foi o parâmetro mais afetado pela ação patogênica dos fungos, e está relacionada à duração desta fase (14 dias) que proporciona ao fungo tempo suficiente para penetrar a pupa e afetar o desenvolvimento do adulto reduzindo sua capacidade de ovipositar. É um aspecto que merece ser avaliado também para outros lepidópteros, pois ocasionará diminuição de insetos na cultura, promovendo o controle da praga nas gerações seguintes. No presente experimento, foi observada a extrusão do fungo nos adultos, apesar da aplicação ter sido feita na fase de pupa.

A ação patogênica de fungos para a fase de pupa de *D. saccharalis* não foi ainda avaliada. No entanto, ALMEIDA (2009) verificou que *B. bassiana* causou mortalidade de pupas de *P. xylostella* que variou de 10 a 46%, e de até 30% dos adultos emergidos de pupas tratadas. Para *M. anisopliae*, a mortalidade de pupas não foi maior que 18%, mas apenas 28% dos adultos emergidos de pupas tratadas sobreviveram, enquanto *I. fumosorosea* promoveu pequena mortalidade de pupas e de adultos emergidos.

Tabela 4. Longevidade e fecundidade de adultos de *Diatraea saccharalis* emergidos de pupas tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*.

Tratamento	Concentração (con. mL ⁻¹)	Longevidade (dias)		Fecundidade ¹ (ovos/fêmea/dia)
		Fêmeas	Machos	
Testemunha		3,81 a	3,41 a	145,24 a
	1,0 x 10 ⁸	1,00 b	2,00 b	0,00 c
M. anisopliae	1,0 x 10 ⁷	1,38 b	1,75 b	0,00 c
	1,0 x 10 ⁶	4,00 a	4,28 a	2,06 c
	1,0 x 10 ⁸	3,13 ab	2,30 b	0,00 c
B. bassiana	1,0 x 10 ⁷	4,08 a	2,65 b	0,00 c
	1,0 x 10 ⁶	2,60 ab	1,75 b	48,54 b
	1,0 x 10 ⁸	3,84 a	2,66 a	62,47 b
I. farinosa	1,0 x 10 ⁷	3,13 ab	3,07 a	121,82 a
	1,0 x 10 ⁶	3,14 ab	3,29 a	113,25 a
Teste F		4,43**	7,36**	14,68**
CV (%)		29,03	22,80	22,80

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (p<0,05).

¹Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em Log x + 1.

Letras minúsculas referem-se à comparação de médias confrontando todos os tratamentos entre si.

Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias das concentrações dentro de cada fungo.

**Significativo a 1% de probabilidade.

Os resultados obtidos para *D. saccharalis* neste trabalho são semelhantes ao de ALMEIDA (2009). *B. bassiana* promoveu mortalidade de 8 a 42% e reduziu significativamente a longevidade de adultos machos em todas as concentrações testadas. *I. farinosa* não se mostrou patogênico para pupas da broca da cana. No entanto, *M. anisopliae* foi patogênico para pupas, causando mortalidade que variou de 12 a 52% e afetou significativamente os adultos emergidos de pupas tratadas. A ação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi observada nas maiores concentrações de conídios, e nos grupos tratados com *I. farinosa* observou-se pouca ou praticamente nenhuma mortalidade confirmada. O revestimento protéico

da pupa fornece uma proteção eficiente contra ataques de parasitas (DE LA ROSA et. al, 2002), mas existem estudos mostrando que o tratamento de pupas com fungos entomopatogênicos reduz a emergência de adultos (EKESI & MANIANIA, 2002).

Os resultados de viabilidade de pupas são condizentes com os de ANAND et al. (2009), que inocularam o isolado ARSEF 7487 de *M. anisopliae* em pupas de *S. litura* e obtiveram mortalidade que variou de 50% a 90%, nas concentrações de $1,2 \times 10^7$ e $4,3 \times 10^8$ con. mL⁻¹, respectivamente, todavia, a maior mortalidade foi obtida usando uma concentração de conídios quatro vezes maior que a deste experimento. Nos experimentos de HICKS et al. (2001), observou-se redução de 60% na viabilidade das pupas de *Panolis flammea* (Dennis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com 10^6 con. mL⁻¹ de *B. bassiana*.

Pupas de *Phthorimaea operculella* (Seller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae) tratadas com *B. bassiana* mostraram grande suscetibilidade (HAFEZ et al., 1997), pois nas concentrações de $1,03$ e $16,5 \times 10^8$ con. mL⁻¹ apenas 36,6 e 10% das pupas se mostram viáveis, respectivamente. A longevidade dos adultos emergidos foi reduzida em até 75% no tratamento com $8,5 \times 10^8$ con. mL⁻¹ e não houve oviposição dos adultos quando as pupas foram tratadas com concentrações maiores que $4,08 \times 10^8$ con. mL⁻¹. Neste trabalho com *D. saccharalis*, a longevidade de machos e fêmeas foi reduzida em 48,68% e 31,76%, respectivamente, utilizando a mesma espécie fúngica, mas com menores concentrações de conídios. Os tratamentos com *B. bassiana* e *M. anisopliae* nas concentrações de $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ con. mL⁻¹ foram suficientes para coibir a oviposição das fêmeas.

4.2. Bioensaios com adultos de *D. saccharalis*:

Somente o isolado de *M. anisopliae* apresentou mortalidade confirmada que diferiu do controle, nas três concentrações avaliadas, chegando a causar 40% de mortalidade nos adultos. Apesar de promoverem uma pequena mortalidade e se

mostrarem patogênicos à esta fase, *B. bassiana* e *I. farinosa* diferiram da testemunha apenas na concentração de 10^7 con. mL⁻¹ (Tabela 5).

A longevidade e fecundidade dos adultos pulverizados não foram afetadas por nenhum dos isolados (Tabela 5), e mantiveram-se dentro dos padrões para a praga (GALLO et al., 2002). Neste mesmo contexto, houve pequena ação dos fungos sobre a viabilidade dos ovos. O tratamento com 10^8 e 10^6 con. mL⁻¹ de *B. bassiana* foi o único a diferir da testemunha, reduzindo a viabilidade para 45,82 e 55,20%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Mortalidade, longevidade e fecundidade de adultos de *Diatraea saccharalis* tratados com diferentes concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria farinosa*.

Tratamento	Concentração (con. mL ⁻¹)	M.C. (%)	Longevidade (dias)		Fecundidade ¹ (ovos/fêmea/dia)	Viabilidade de ovos (%)
			Fêmeas	Machos		
Testemunha		0,0 d	3,04 a	2,9 a	96,91 a	79,11 a
	$1,0 \times 10^8$	40,0 Aa	3,44 a	3,28 a	94,26 a	68,84 abc
<i>M. anisopliae</i>	$1,0 \times 10^7$	36,0 Aab	3,36 a	3,04 a	143,11 a	70,93 ab
	$1,0 \times 10^6$	40,0 Aab	3,32 a	3,04 a	120,06 a	64,17 abc
	$1,0 \times 10^8$	12,0 Acd	3,52 a	3,16 a	101,96 a	45,82 c
<i>B. bassiana</i>	$1,0 \times 10^7$	18,0 Aabc	3,24 a	3,16 a	83,36 a	57,78 abc
	$1,0 \times 10^6$	12,0 Acd	3,48 a	3,04 a	162,97 a	55,20 bc
	$1,0 \times 10^8$	10,0 Acd	3,60 a	2,96 a	200,15 a	64,59 abc
<i>I. farinosa</i>	$1,0 \times 10^7$	14,0 Abc	3,24 a	3,00 a	103,81 a	63,27 abc
	$1,0 \times 10^6$	0,0 Ad	3,04 a	3,16 a	96,91 a	58,86 abc
Teste F		10,32**	1,13 ^{ns}	0,46 ^{ns}	1,55 ^{ns}	3,52**
CV (%)		11,24	10,45	11,81	14,00	17,42

M.C.: Mortalidade confirmada. ¹Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em Log x + 1. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% (p<0,05). Letras minúsculas referem-se à comparação de médias confrontando todos os tratamentos entre si. Letras maiúsculas referem-se à comparação de médias das concentrações dentro de cada fungo. **Significativo a 1% de probabilidade;

^{ns}Não significativo.

Os resultados obtidos mostraram pouca ação patogênica sobre adultos da broca da cana. Isso é consequência do próprio ciclo de vida do inseto, pois os adultos possuem longevidade média de cinco dias (GALLO et al., 2002), tempo suficiente para ocorrer a germinação do conídio e penetração do fungo (ALVES, 1998), porém, curto demais para causar severos distúrbios no inseto e promover a sua morte.

Em seus ensaios, ALMEIDA (2009) pulverizou adultos de *P. xylostella* com a CL₉₀ de *B. bassiana*, de *M. anisopliae* e de *I. fumosorosea* ($2,0 \times 10^8$, $1,77 \times 10^8$ e $8,65 \times 10^7$ con. mL⁻¹, respectivamente), e verificou patogenicidade de todos os fungos, com mortalidades que chegaram a 100% para os dois primeiros e 94% para *I. fumosorosea*. No atual trabalho os fungos causaram menor mortalidade, mas deve-se ressaltar que foram utilizadas concentrações de conídios quase duas vezes menores para *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e *D. saccharalis* tem menor longevidade que *P. xylostella*.

Em experimento com adultos de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) tratados com *M. anisopliae* isolado UFRPE-6 na concentração de 10^7 con. mL⁻¹, PIRES et al. (2009), obtiveram mortalidade de 37,14% dos insetos, dado semelhante ao obtido neste experimento, onde o uso da mesma espécie e concentração fúngica promoveu mortalidade de 36%.

Os resultados de fecundidade de *D. saccharalis* são congruentes com os de OLIVEIRA et al. (2008), em que fêmeas provenientes de lagartas inoculadas com 10^3 , 10^4 e 10^5 con. mL⁻¹ de *M. anisopliae*, não foram afetadas e a viabilidade dos ovos foi reduzida em até 40%. No ensaio com 10^5 con. mL⁻¹ de *B. bassiana*, houve redução da fecundidade, e a viabilidade foi afetada nos tratamentos com 10^4 e 10^5 con. mL⁻¹. No presente experimento a fecundidade não foi afetada pelos fungos e apenas as concentrações de 10^6 e 10^8 con. mL⁻¹ de *B. bassiana* promoveram significativa redução na viabilidade dos ovos.

V. CONCLUSÃO

Pupas e adultos de *D. saccharalis* são susceptíveis a ação patogênica de *B. bassiana* e principalmente de *M. anisopliae*, pois ambos causaram mortalidade e afetaram alguns parâmetros dessas fases do ciclo biológico do inseto, especialmente longevidade e fecundidade, notadamente nas maiores concentrações de conídios. *I. farinosa* pouco afetou a mortalidade e parâmetros do ciclo biológico do inseto.

VI. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.B. **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e sua ação em inimigos naturais da praga.** 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. **In: Controle Microbiano de Insetos.** 2.ed., Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 289-381.

ANAND, R.; PRASAD, B.; TIWARY, B. N. Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. **Biological Control**, London, v. 54, n. 1, p. 85-92, 2009.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. **In: PARRA, J.R.P. et al. Controle biológico no Brasil: predadores e parasitóides.** São Paulo: Manole, 2002, p. 409-425.

DE BORTOLI, S.A.; DÓRIA, H. O S.; ALBERGARIA, N.M.M.S.; BOTTI. M.V. Biological aspects and damage of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in

sorghum, under different doses of nitrogen and potassium. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 267-273, 2004.

DE LA ROSA, W.; LOPES, F.L.; LIEDO, P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 95, n. 1, p. 36-43, 2002.

EKESI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 7-17, 2002.

ESTAT – **Sistema para análises estatísticas**, V. 2.0 (livre), 1997, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Departamento de Ciências Exatas. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download2/software/estat/>>

FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A.C.B.; MONTEIRO, A.C.M.. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1309-1312, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; 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, 920 p.

HAFEZ, M.; ZAKI, F. N.; MOURSY, A.; SABBOUR, M. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the tuber moth *Phthorimaea operculella* (Seller). **Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz**, Berlin, v. 70, p. 158-159, 1997.

HICKS, B. J.; WATT, A. D.; COSENS, D. The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty

moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 149, p. 275-281, 2001.

KLEESPIES, R.G., HUGER, A.M.; ZIMMERMANN, G. Diseases of Insects and Other Arthropods: Results of Diagnostic Research Over 55 years. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 439-484, 2008.

NGUYEN, T. H. N.; BORGEMEISTER, C.; POEHLING, H. M.; ZIMMERMANN, G. Laboratory investigations on the potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and pupae. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 853-864, 2007.

OLIVEIRA, M. A. P.; MARQUES, E. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; BARROS, R. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

PIRES, L. M.; MARQUES, E. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; VÄNNINEN, I.; HOKKANKEN, H. Ultrastructure of *Tuta absoluta* parasitised eggs and the reproductive potential of females after parasitism by *M. anisopliae*. **Micron**, New York, v. 40, p. 255-261, 2009.

VÄNNINEN, I.; HOKKANKEN, H. Efficacy of entomopathogenic fungi and nematodes against *Argyresthia conjugella* (Lep.: Yponomeutidae). **Entomophaga**, Paris, v. 42, n. 3, p. 377-385, 1997.

WEKESA, V. W.; KNAPP, M.; MANIANIA, N. K.; BOGA, H. I. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 130, n. 3, p. 155-159, 2006.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 865-901, 2008.