



VIRULÊNCIA DE BLASTOSPOROS DE *Beauveria caledonica* SOBRE COLEOBROCAS

Lucas Sartori Ramos **Fonseca**¹; Ana Clara Vieira **Cangani**²; Daniel Paraizo **Santos**³; Helena Ferreira **Okabayashi**⁴; Jeanne Scardini **Marinho-Prado**⁵

Nº 23409

RESUMO – *Dois cultivos de grande importância para o Brasil, a bananicultura e a cana-de-açúcar têm em comum o fato de terem coleobrocas como praga primária de suas plantas, o moleque-da-bananeira (Cosmopolites sordidus) e o bicudo-da-cana (Sphenophorus levis). A recente detecção do fungo Beauveria caledonica em indivíduos de C. sordidus em campo apresentou uma nova possibilidade para o controle biológico de coleópteros-praga. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a virulência de blastosporos de B. caledonica em solução oleosa sobre indivíduos de C. sordidus e S. levis. Os blastosporos foram produzidos por meio de fermentação líquida e posteriormente adicionados a uma formulação oleosa. Os insetos foram submersos na formulação por cinco segundos e depois mantidos isolados com um pequeno pedaço de alimento ideal para sua dieta, em BOD a 25°C. Acompanhou-se diariamente o bioensaio para avaliação da mortalidade dos indivíduos, bem como a esporulação após a morte. Tanto indivíduos de C. sordidus, quanto de S. levis que receberam suspensão com blastosporos em óleo emulsionável apresentaram probabilidade de sobrevivência significativamente reduzida se comparada com os indivíduos que receberam o tratamento controle. Esses resultados indicam que blastosporos de B. caledonica suspensos em solução oleosa causam maior mortalidade a indivíduos de C. sordidus do que os mesmos blastosporos em água e que a formulação oleosa do fungo reduz significativamente a sobrevivência de indivíduos de S. levis.*

Palavras-chaves: Fungo entomopatogênico, bicudo-da-cana, moleque-da-bananeira, *Sphenophorus levis*, *Cosmopolites sordidus*.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, IB / UNICAMP, Campinas-SP; l156408@dac.unicamp.br

2 Bolsista Faped: Graduação em Biotecnologia, UFSCAR, São Carlos-SP

3 Bolsista ITI-A: Graduação em Ciências Biológicas, IB / UNICAMP, Campinas-SP.

4 Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, IB / Unicamp, Campinas-SP.

5 Orientador: Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; jeanne.marinho@embrapa.br.



ABSTRACT – *Two crops of great importance for Brazil, banana and sugarcane cultivation have in common the fact that they have beetles as primary pests of their plants, the banana borer (Cosmopolites sordidus) and the sugarcane weevil (Sphenophorus levis). The recent detection of the fungus Beauveria caledonica in individuals of C. sordidus in the field presented a new possibility for the biological control of pest coleopterans. Thus, this work aimed to evaluate the virulence of blastospores of B. caledonica in oil-based formulation on individuals of C. sordidus and S. levis. The blastospores were produced by liquid fermentation and added to an emulsifiable oil dispersion. The insects were submerged in each suspension for five seconds, then isolated with a little portion of food, in a BOD at 25°C. The bioassay was monitored daily to assess the mortality of individuals, as well as sporulation after death. In both species, the probability of survival of individuals that received blastospores in emulsifiable oil was significantly reduced when compared with those treated with control treatments. These results show that blastospores of B. caledonica in oil-based formulation cause greater mortality to C. sordidus than the same blastospores in water and that the oily formulation of the fungus significantly reduces the survival of S. levis.*

Keywords: Entomopathogenic fungi; banana borer; sugarcane weevil; *Cosmopolites sordidus*; *Sphenophorus levis*.

1. INTRODUÇÃO

A banana é a fruta mais consumida do Brasil, que é o quarto maior produtor do mundo, atrás apenas da Índia, China e Indonésia. Praticamente tudo o que é produzido na bananicultura brasileira é destinado ao mercado interno, sendo exportado apenas 1% da produção (CNA, 2021). Outra cultura agrícola de grande importância para o país é a cana-de-açúcar, com mais de 650 milhões de toneladas produzidas (IBGE, 2023). Além de ser o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, o Brasil é também o maior exportador de açúcar, correspondendo a 21% da produção global e o segundo maior produtor de etanol (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2023).

A importância econômica dessas espécies comerciais evidencia a importância em aprimorar o manejo para a proteção fitossanitária de seus cultivos. Além da grande importância para o desenvolvimento e abastecimento do país, ambos têm em comum o fato de serem atacados por besouros da família Curculionidae (ordem Coleoptera): o moleque-da-bananeira (*Cosmopolites*



sordidus), principal praga dos bananais (FANCELLI et al., 2015), e o bicudo-da-cana (*Sphenophorus levis*), uma das pragas mais importantes da cana-de-açúcar (VINHA et al., 2020).

O controle feito com a utilização de agrotóxicos apresenta grande impacto ambiental e danos para a saúde de trabalhadores e consumidores, gerando uma crescente demanda por métodos de controle alternativos aos agentes químicos (RIBEIRO, et al., 2012). Nessa busca por alternativas mais sustentáveis, o interesse pelo controle microbiológico de insetos tem sido crescente.

A aplicação de métodos de controle biológico que utilizam fungos entomopatogênicos é uma boa alternativa ao uso de agrotóxicos. Atualmente, *Beauveria bassiana* é o organismo mais utilizado para o combate de pragas no Brasil e o gênero *Beauveria* apresenta uma ampla distribuição geográfica (DALZOTO; UHRY, 2009). O fungo *Beauveria caledonica* foi recentemente isolado de indivíduos de *C. sordidus* em plantios de banana no Vale do Ribeira (MASCARIN et al., 2022). Sua avaliação em laboratório revelou um bom potencial de conídios em formulação oleosa, com cerca de 70% de eficiência em laboratório contra o moleque-da-bananeira. O resultado obtido com a formulação oleosa foi melhor do que o obtido com os conídios em água (MASCARIN et al., 2022).

A fermentação líquida submersa, praticada em biorreatores automatizados, tem recebido maior atenção por apresentar vantagens sobre a fermentação sólida-estática, utilizada para produção massal de conídios (MASCARIN et al., 2015). Há evidências de que blastosporos obtidos pela fermentação líquida submersa de fungos entomopatogênicos sejam tão virulentos quanto conídios, ou até mesmo superiores (MASCARIN et al., 2015; IWANICKI et al., 2018; 2020).

Assim, considerando a virulência de conídios de *B. caledonica* ao moleque-da-bananeira, o potencial dos blastosporos de fungos, o bom resultado obtido com a formulação oleosa dos esporos e a semelhança taxonômica entre ambos os insetos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a virulência de blastosporos de *Beauveria caledonica* em formulação oleosa sobre os coleópteros *C. sordidus* e *S. levis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os insetos utilizados no bioensaio foram obtidos do campo e mantidos no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.



Os indivíduos de *Cosmopolites sordidus* foram coletados no dia 27/01/2023 em armadilhas do tipo telha instaladas no bananal da área experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), na cidade de Pariquera-Açu, SP. Após coletados, os adultos foram levados ao laboratório e mantidos em potes plásticos (18,5 x 18,5 x 7,0 cm) com tampa telada, contendo pedaços de pseudocaule, em BOD a 25 °C e 24 h de escotofase.

Os insetos da espécie *Sphenophorus levis* foram coletados no dia 17/03/2023 em iscas instaladas em uma área de produção de cana-de-açúcar da Usina Alta Mogiana, em São Joaquim da Barra, SP. Após coletados, os adultos foram levados ao laboratório e mantidos em potes plásticos (14,5 x 10,0 x 5,0 cm) com pequenos furos na tampa, contendo pedaços de 15 cm de colmo de cana cortados verticalmente, em BOD a 25 °C e 24 h de escotofase.

Os indivíduos de *S. levis* receberam dois tratamentos: SL1 – Controle (sem fungo); e SL2 – fermentado líquido de *B. caledonica* em óleo emulsionável (7×10^7 blastosporos/mL). Os indivíduos de *C. sordidus* receberam três tratamentos: CS1 – Controle (sem fungo); CS2 – Fermentado líquido de *B. caledonica* em óleo emulsionável (7×10^7 blastosporos/mL); e CS3 – Fermentado líquido de *B. caledonica* (1×10^8 blastosporos/mL). Cada tratamento foi composto por três repetições, contendo oito insetos cada. Os insetos foram imersos individualmente por cinco segundos na suspensão do respectivo tratamento e individualizados em um poço da bandeja de avaliação contendo uma porção de alimento (pedaço de cana para SL1 e SL2 e pedaço de pseudocaule de bananeira para CS1, CS2 e CS3). A bandeja utilizada para avaliação é confeccionada em material plástico, possui 32 poços de dimensões 4,0 x 4,0 x 2,0 cm cada e tampas de plástico (Figura 1).



Figura 1. Bandeja de condução dos bioensaios com os insetos que receberam seus respectivos tratamentos e alimento.

Para as suspensões foi utilizado o fungo *Beauveria caledonica* isolado CMA1810 (BRM 061147) cultivado em placas de Petri com meio de batata dextrose ágar (BDA) a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h por duas semanas até esporulação. Os conídios para a fermentação líquida foram coletados raspando as placas descritas acima com 10 mL de uma solução aquosa estéril a 0,04% de Tween 80[®] (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). O meio foi inoculado com a suspensão de conídios, em Erlenmeyers de 250 mL, que foi colocado em incubadora shaker por três dias, a ± 28 °C e 250 rpm para a produção de blastosporos, obtendo o fermentado líquido (tratamento CS2) (MASCARIN et al., 2015). A suspensão preparada com fermentado de *B. caledonica* em óleo emulsionável (tratamentos SL2 e CS2) foi composta por 93% v/v de óleo de girasol, 5% v/v de emulsificante vegetal não iônico e 2% v/v de intensificador de oleosidade Break-Trhu[®] OE446 (Evonik, Alemanha), conforme metodologia de Mascarin et al. (2022). A solução controle, utilizada nos tratamentos SL1 e CS1, foi preparada com água destilada e Tween 80[®] a 0,04%.

Os bioensaios foram acompanhados diariamente, por 13 dias, para observação da mortalidade dos indivíduos de *C. sordidus* e *S. levis*. Os insetos mortos eram colocados em câmara úmida para confirmação de morte por fungo através da esporulação.

A análise de sobrevivência para os tratamentos foi realizada com o modelo Kaplan-Meier, utilizando o software R.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Moleques-da-bananeira que foram contaminados com a suspensão contendo blastosporos de *B. caledonica* em óleo emulsionável apresentaram probabilidade de sobrevivência menor do que os insetos que receberam a suspensão dos blastosporos em solução aquosa ou o tratamento controle (Figura 2). As mortes de *C. sordidus* observadas no tratamento com *B. caledonica* em formulação oleosa começaram no segundo dia de avaliação do bioensaio e chegaram a 91,6% no 13º dia do experimento.

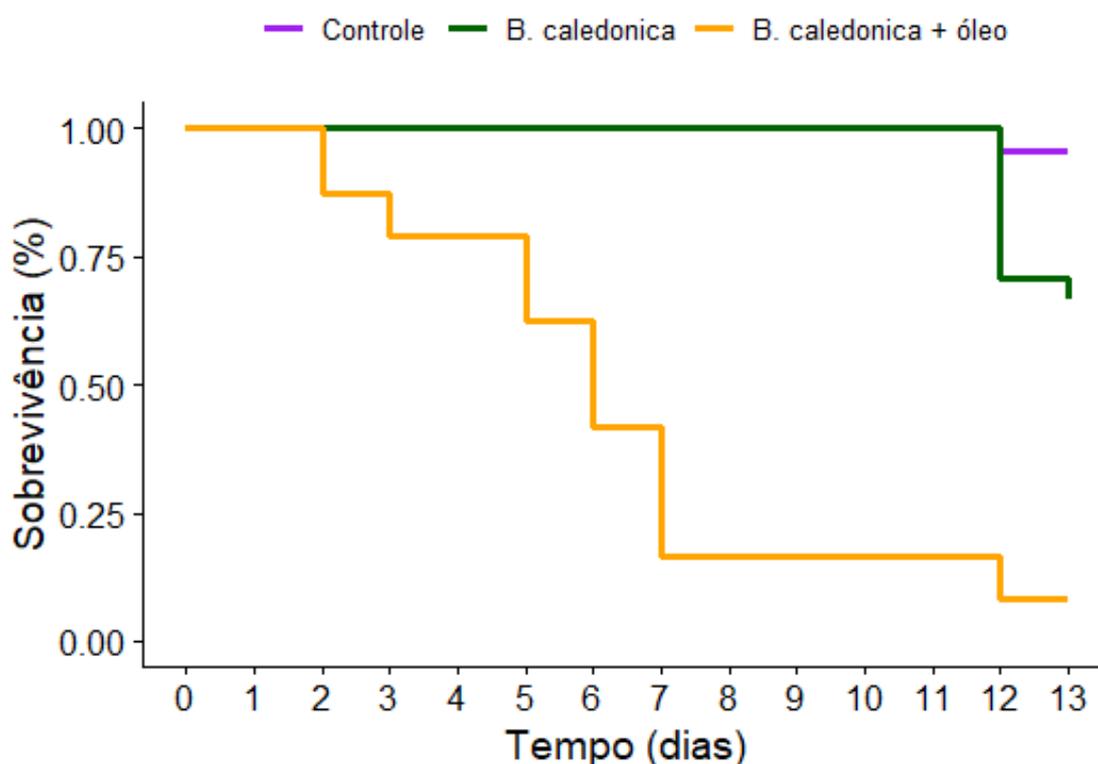


Figura 2. Suscetibilidade de adultos de *Cosmopolites sordidus* a blastosporos não formulados e formulados à base de óleo (7×10^7 blastosporos mL^{-1}) de *Beauveria caledonica* (CMAA1809) em laboratório ($25 \pm 2,0$ °C e 24 h de escuro). A análise de Kaplan-Meier indica uma significativa diferença ($p < 0,05$) nas curvas de sobrevivência entre os tratamentos.

O valor TL50 (tempo médio até a morte) para moleques-da-bananeira tratados com a formulação à base de óleo foi de seis dias (95% entre 5-7 dias), enquanto os insetos dos tratamentos controle e de blastosporos em suspensão aquosa com Tween 80[®] não atingiram 50% de mortalidade



durante o período avaliado do experimento e, portanto, não foi possível determinar seus valores de TL50. O tratamento de blastosporos em suspensão oleosa apresentou esporulação em 85,7% dos insetos mortos, enquanto a confirmação de insetos mortos pela infecção de blastosporos em suspensão aquosa foi de 88,9%.

Estudos que utilizaram suspensão de conídios de *B. caledonica* em *C. sordidus* obtiveram uma mortalidade moderada (40-60% após 10 dias) dos indivíduos quando tratados com inóculo em alta concentração (Mascarin et al., 2022). Por sua vez, os tratamentos deste trabalho, que utilizam blastosporos, atingiram uma mortalidade de aproximadamente 80% no mesmo período de 10 dias, destacando o grande potencial do uso de blastosporos de *B. caledonica* para o controle biológico entomopatogênico desse inseto. Assim, como observado para conídios (MASCARIN et al., 2022), a formulação oleosa potencializou o efeito dos esporos do fungo e mais estudos devem ser realizados para verificar as razões dessa vantagem.

Blastosporos de *B. caledonica* em óleo emulsionável também foram eficientes ao causar mortalidade sobre *S. levis*. Os insetos infectados pelo fungo tiveram a sobrevivência significativamente reduzida em relação aos insetos do tratamento controle, que não foram infectados (Figura 3).

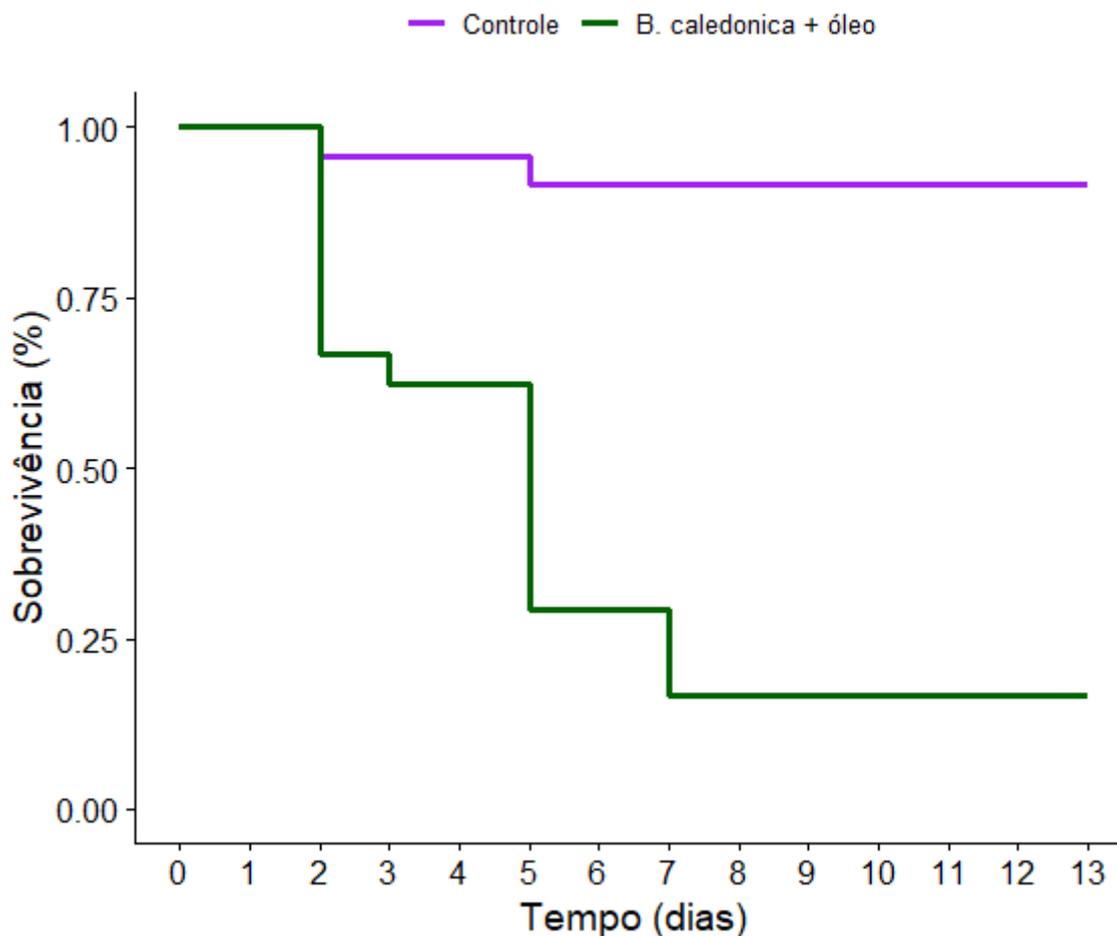


Figura 3. Suscetibilidade de adultos de *Sphenophorus levis* a blastosporos formulados à base de óleo (7×10^7 blastosporos mL⁻¹) de *Beauveria caledonica* (CMAA1809) em laboratório ($25 \pm 2,0$ °C e 24 h de escuro). A análise de Kaplan-Meier indica uma significativa diferença ($p < 0,05$) nas curvas de sobrevida entre os tratamentos.

O valor TL50 para bicudos-da-cana que receberam a formulação à base de óleo foi de cinco dias (95% entre 3-7 dias). As mortes de bicudos-da-cana observadas no tratamento com *B. caledonica* em formulação oleosa começaram no segundo dia de avaliação do bioensaio e chegaram a 83,3% no 13º dia do experimento, com 58,8% de esporulação dos insetos mortos e colocados em câmara úmida.

Em estudo avaliando a eficácia de *Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana* no controle de *S. levis* na cana-de-açúcar, somente o fungo *M. anisopliae* causou redução da população do inseto em campo (VINHA et al., 2020). Os resultados apresentados neste trabalho com blastosporos de *B.*



caledonica apresentaram bom potencial para o controle do bicudo-da-cana e estudos avaliando seu desempenho em campo precisam ser realizados.

4. CONCLUSÃO

- Blastosporos de *B. caledonica* em formulação oleosa causam maior mortalidade de *C. sordidus* do que os blastosporos em água.
- O fungo *B. caledonica* em formulação oleosa reduz significativamente a probabilidade de sobrevivência de *S. levis*.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida, à Embrapa pelo financiamento do projeto e às equipes do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) e Laboratório de Extratos Orgânicos (LEO) da Embrapa Meio Ambiente.

6. REFERÊNCIAS

- CNA. **Dia da banana: fruta é cultivada em todos os estados**, 2021. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/dia-da-banana-fruta-e-cultivada-em-todos-os-estados#:~:text=Segundo%20o%20IBGE%2C%20a%20estimativa,%2C%20sendo%20exportado%20apenas%201%25>. Acesso em: 03 ago. 2023.
- DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle Biológico de Pragas no Brasil por meio de *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. **Biológico**, v. 71. n. 1. p. 37-41, 2009.
- FRANCELLI, M. et al. Artrópodes-pragas da bananeira e controle. **Informe agropecuário**, v.36, n.288, p.96-105, 2015.
- IWANICKI, N. S. et al. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-13, 2020.



IWANICKI, N. S. et al. Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. **Fungal Biology**, v.122, n. 9, p. 883–890, 2018.

IBGE. **LSPA**: levantamento sistemático da produção agrícola. 2023. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html>>. Acesso em 10 maio 2023.

MASCARIN, G. M. et al. Natural occurrence of *Beauveria caledonica*, pathogenicity to *Cosmopolites sordidus* and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Pest. Management Science**, v.78, p. 4458-4470, 2022.

MASCARIN, G. M. et al. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, 2015. p. 11-20,2015.

RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, S. O.; BORGES, A. L. Caracterização física e química de bananas produzidas em sistemas de cultivo convencional e orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34. n. 03. p. 774-782, 2012.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. **Setor sucroenergético**. Disponível em: <<https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/>>. Acesso em: 03 ago. 2023.

VINHA, F. B. et al. Entomopathogenic fungi on the control of *Sphenophorus levis* in sugarcane crop. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 19, n. 3, p. 280-288, 2020.