

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE  
DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Fábio Rodrigo de Oliveira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE DE**  
*Anticarsia gemmatalis* **HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

por

**Fábio Rodrigo de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Thereza Bastos Dequech**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE DE  
*Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

elaborada por  
**Fábio Rodrigo de Oliveira**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Agrobiologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Sônia Thereza Bastos Dequech, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente Orientador)

---

**Neiva Monteiro de Barros, Dr<sup>a</sup> (UCS)**

---

**Antônio Carlos Ferreira da Silva, Dr (UFSM)**

Santa Maria, 15 de março de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus amados pais,*

*Márcia Regina Zimmermann Neves e João Carlos de Oliveira*

**Dedico...**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Márcia Regina Zimmermann Neves e João Carlos de Oliveira e à minha irmã Fabiana Oliveira, por estarem sempre comigo em todos os momentos, pelo carinho, amor e apoio incondicional, amo vocês.

Aos professores membros do comitê de orientação, especialmente à Prof<sup>a</sup> Sônia Thereza Bastos Dequech e ao Prof. Antônio Carlos Silva pelas conversas, apoio e direcionamento do trabalho. À Prof<sup>a</sup> Elena Blume e à Maria, pelas constantes conversas, apoio e orientações.

Aos funcionários da Universidade Federal de Santa Maria, que de alguma forma contribuíram com ideias e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À equipe do Laboratório de Quarentena Costa Lima, da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna/SP, em especial à Dra Jeanne Scardini, pelo acolhimento e troca de experiências durante passagem por essa instituição de pesquisa.

Aos amigos Marcos Marquardt e Fabricio Luz, da empresa BRBac, pela disponibilidade de estrutura, parceria e troca de experiências.

Aos meus familiares, principalmente os mais próximos, em especial Mário Sarzi-Sartori, minha avó Nelsi Neves, meus tios Mariane Neves Possani e Jonas Possani, minha prima Taíse Possani, meus tio Norberto Zimmermann e Sandra dos Santos Zimmermann que compartilharam e me auxiliaram muito em vários momentos desta caminhada.

À Marianna, pelo carinho, apoio e companheirismo.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, especialmente àqueles novos que fiz durante o curso de pós-graduação, Ana Paula Estevo, Liange Reck, Rodrigo Fornari, Leandro da Luz, Vinícius Sturza e Daniele Machado. Vinícius e Daniele, pelo grande apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Às colegas de laboratório e campo, Deise Cagliari e Claudia Rasche, pelo auxílio em diferentes fases do desenvolvimento desse estudo.

Ao Leandro do Prado Ribeiro, pelo auxílio no cálculo das Concentrações Letais.

À Luciana Nunes de Oliveira, por compartilhar os bons momentos e as angústias durante os dois anos em que foi desenvolvido o trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade em colaborar com este trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### PROSPECÇÃO DE FUNGOS PARA O CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

AUTOR: FÁBIO RODRIGO DE OLIVEIRA  
ORIENTADOR: SÔNIA THEREZA BASTOS DEQUECH  
Local e data da defesa: Santa Maria, 15 de março de 2013.

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, é considerada o principal inseto-praga dessa cultura. Para o seu controle, uma alternativa aos métodos químicos é o controle microbiano, inserido dentro do controle biológico de pragas. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento de fungos de lagartas de *A. gemmatalis* contaminadas e avaliar o potencial patogênico das culturas fúngicas isoladas. Para o fungo que ocasionou a maior porcentagem de mortalidade das lagartas expostas, foi verificada a capacidade de produção enzimática e a viabilidade de produção. Ainda, foi avaliada a patogenicidade e foram estabelecidas a  $DL_{50}$  e a  $DL_{90}$  da melhor formulação obtida. O isolamento dos fungos se deu partir de lagartas, em estágio de mumificação, obtidas na região central do Estado do Rio Grande do Sul. A mortalidade das lagartas, aliada à observação de estágio de mumificação nas mesmas, serviu para identificar a espécie *Aspergillus nomius* como apresentando o melhor resultado (cerca de 95% de mortalidade) dentre os 20 fungos isolados. Não se observou o crescimento desse fungo em meios de cultura ricos em quitina e lipídios. Porém, houve crescimento em meio contendo proteína, podendo-se sugerir que o fungo é um bom produtor de enzimas do tipo proteases. No teste visando avaliar a viabilidade de produção de *A. nomius*, a concentração média (conídios.mL<sup>-1</sup>) de esporos em todos os tratamentos foi semelhante, sendo que a maioria ficou na casa de 10<sup>10</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>. Visualmente, no tratamento com 25% de volume de água por volume de arroz (50mL), adição de caseína no meio e adição de 6 mL de suspensão de esporos do fungo *A. nomius*, e que resultou em 2,88x10<sup>10</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>, o arroz ficou mais solto e, com isso, mais aerado, o que pode ter resultado numa tendência de melhor desenvolvimento do fungo. Foi avaliada a patogenicidade desse formulado, obtendo-se um alto nível de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis*, semelhante aos resultados obtidos quando foram aplicadas suspensões de esporos originadas diretamente das placas de crescimento do fungo. Ainda, na mesma concentração de conídios mencionada, porém testando-se várias dosagens, foram obtidos valores em torno de 2,23x10<sup>7</sup> e 1,46x10<sup>10</sup> mL.lagarta<sup>-1</sup>, correspondentes à  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , respectivamente, estimadas utilizando-se o método de Probit. Por fim, conclui-se que *A. nomius* apresenta um alto potencial com vistas a uma possível utilização como agente de controle biológico de *A. gemmatalis* em cultivos da soja. Porém, por se tratar de um fungo com potencial patogênico para o homem e para outros animais da fauna nativa, é necessário aprofundar estudos relacionados à produção de aflatoxinas por esse entomopatógeno e seus efeitos no ambiente.

**Palavras-chave:** controle biológico, entomopatógenos, *Aspergillus nomius*, lagarta-da-soja.

## ABSTRACT

Master of Science Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **PROSPECTING OF FUNGI FOR CONTROL OF *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

AUTHOR: FÁBIO RODRIGO DE OLIVEIRA

ADVISOR: SÔNIA THEREZA BASTOS DEQUECH

Location and date of presentation: Santa Maria, March 15<sup>th</sup>, 2013.

The velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, is considered a major insect pest of soybean. For its control, an alternative to chemical methods is the microbial control, inserted into the pest biological control. Thus, the objective of this study was to isolate fungi from contaminated *A. gemmatalis* caterpillars and evaluate the pathogenic potential of isolated fungal cultures. For the fungus that caused the greatest mortality percentage of larvae exposed, enzymatic production capacity and production feasibility were found. Still, pathogenicity was evaluated and LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> from the best formulation obtained were established. The fungi isolation occurred from caterpillars on mummification stage, obtained in the central region of Rio Grande do Sul. Larvae mortality, allied to observation of mummification stage, lead to identify the species as *Aspergillus nomius* presenting the best results (about 95% mortality) among the 20 isolated-fungi. There was no growth of this fungus in culture media rich in chitin and lipids. However, there was growth in a media containing protein, which might suggest that the fungus is a good protease type enzyme producer. Testing to evaluate *A. nomius* production feasibility, the average spore's concentration (conidia mL<sup>-1</sup>) in all treatments were similar, with the majority stayed with 10<sup>10</sup> conidia.mL<sup>-1</sup>. Visually, the treatment with 25% water volume per rice volume (50mL), addition of casein in the medium and adding of 6 mL of spore suspension of the fungus *A. nomius*, which resulted in 2.88 x10<sup>10</sup> conidia mL<sup>-1</sup>, the rice was looser and, therefore, more aired, which may have resulted in a trend toward to a better fungus development. It was evaluated the pathogenicity of this formulated, yielding a high level of mortality among *A. gemmatalis* larvae, similar to results obtained when spore suspensions originated were applied directly from the fungus growth plates. Yet, at the same conidia concentration mentioned, but testing various dosages, values around 2,23x10<sup>7</sup> and 1,46x10<sup>10</sup> mL.lagarta<sup>-1</sup> were obtained, corresponding to LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, respectively, estimated by probit method. Finally, it is concluded that *A. nomius* presents a high potential regarding to a possible use as *A. gemmatalis* biological control agent in soybean crops. However, because it is a fungus with pathogenic potential for humans and other native fauna animals, it is necessary further studies related to aflatoxin production by this pathogen and its effects on the environment.

**Key words:** biological control, entomopathogens, *Aspergillus nomius*, velvetbean caterpillar

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Adulto de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	18
FIGURA 2 - Ovos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	18
FIGURA 3 - Lagarta de <i>Anticarsia gemmatalis</i> de terceiro ínstar.....	19
FIGURA 4 - Pupas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	21
FIGURA 5 - <i>Anticarsia gemmatalis</i> contaminada com o fungo <i>Nomuraea rileyi</i> , antes da esporulação do fungo.....	26
FIGURA 6 - Vista frontal da gaiola de oviposição com adultos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> ....	40
FIGURA 7 - Potes com dieta alimentar, utilizados na criação de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	40
FIGURA 8 - Unidade experimental para avaliação de patogenicidade. Recipiente plástico de um litro com areia esterilizada no fundo e lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> sobre a dieta alimentar.....	42
FIGURA 9 - Unidade experimental para avaliação de produção de fungo entomopatogênico. ....	46
FIGURA 10 - Lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> coletadas em lavouras de soja da região do Rio Grande do Sul, contaminadas com fungos entomopatogênicos .....	49
FIGURA 11 - Fungos isolados em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, incubados em BOD com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas.....	50
FIGURA 12 - Lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> mortas por fungo entomopatogênico no tratamento AS12, apresentando estágio de mumificação. Temperatura de 25°C e umidade relativa aproximada de 60% .....	53
FIGURA 13 - Imagens microscópicas das estruturas (hifas e conióforos) de <i>Aspergillus nomius</i> obtidas no Laboratório de Interação Organismos-Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria (aumento 40 vezes).....	54
FIGURA 14 - Crescimento de <i>Aspergillus nomius</i> em meio de cultura rico em proteínas. Temperatura 25°C, fotoperíodo de 12 horas .....	57

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Alguns fungos entomopatogênicos que ocorrem em lepidópteros no Brasil. ....	25
TABELA 2 - Composição e modo de preparo do meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar).....	37
TABELA 3 - Composição e modo de preparo da dieta alimentar para a criação de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	39
TABELA 4 - Ingredientes e modo de preparo do meio de cultura Luria Bertani, utilizado para a avaliação da produção de lipase de fungos entomopatogênicos.....	43
TABELA 5 - Ingredientes e modo de preparo do meio de cultura utilizado para a avaliação da produção de proteases de fungos entomopatogênicos.....	44
TABELA 6 - Ingredientes e modo de preparo do meio de cultura utilizado para a avaliação da produção de quitinase de fungos entomopatogênicos.....	44
TABELA 7 - Caracterização dos doze tratamentos realizados para a produção do fungo entomopatogênico isolado.....	46
TABELA 8 - Diferentes dosagens, da formulação em que se obteve o melhor crescimento de fungo entomopatogênico, testadas em lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	48
TABELA 9 - Avaliação de virulência de 20 fungos isolados (AS1 a AS20), através da inoculação de 0,5 mL de suspensão de esporos, e do tratamento testemunha (água destilada e esterilizada) (T) sobre lagartas de quarto ínstar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (n= 50). Temperatura de 25°C e umidade relativa aproximada de 60%.....	51
TABELA 10 - Avaliação de virulência de 20 fungos isolados (AS1 a AS20), através da imersão das lagartas em suspensão de esporos. n= 50. Temperatura de 25°C e umidade relativa aproximada de 60%.....	52
TABELA 11 - Concentração média (conídios.mL <sup>-1</sup> ) de esporos de <i>Aspergillus nomius</i> tendo como substrato arroz pré-cozido e autoclavado em diferentes volumes de água para cozimento do arroz e quantidades (mL) de suspensão de esporos, com adição ou não de caseína no meio. Temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.....	58
TABELA 12 - Mortalidade de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> a partir da inoculação de 0,5 mL de e imersão das lagartas em suspensão de esporos de <i>Aspergillus nomius</i> e dos tratamentos testemunha (água destilada e esterilizada). (n= 50). Temp.: 25°C; U.R.: 60%; Fotofase: 12 h.....	60
TABELA 13 - Mortalidade de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> utilizando-se diferentes dosagens de formulação de <i>Aspergillus nomius</i> com 2,88x10 <sup>10</sup> conídios.mL <sup>-1</sup> .....	61

TABELA 14 - Estimativa da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (em mL.lagarta<sup>-1</sup>) e intervalo de confiança do fungo *Aspergillus nomius* para lagartas de *Anticarsia gemmatalis*.....62

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 A cultura da soja.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Insetos-praga da soja.....	16
<b>2.2 Controle biológico de insetos-praga.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Fungos entomopatogênicos.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Fungos produtores de micotoxinas.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Produção de fungos entomopatogênicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS... ..</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Isolamento de fungos entomopatogênicos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Criação de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Avaliação de virulência.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Avaliação da produção de enzimas.....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Lipase.....	42
3.4.2 Protease.....	43
3.4.3 Quitinase.....	44
<b>3.5 Produção do fungo entomopatogênico isolado.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 Virulência da melhor formulação obtida.....</b>	<b>46</b>
<b>3.7 Análise dos dados.....</b>	<b>48</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Fungos isolados e avaliação de virulência em <i>Anticarsia gemmatalis</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Avaliação de produção de enzimas por <i>Aspergillus nomius</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 Produção de <i>Aspergillus nomius</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Virulência da melhor formulação obtida.....</b>	<b>59</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

# 1 INTRODUÇÃO

No contexto das grandes culturas produtoras de grãos, a soja figura como uma das principais e foi a que mais cresceu em termos percentuais nas últimas décadas, tanto no Brasil quanto em nível mundial. A produção de soja no Brasil, na safra 2011/2012, foi de 68,75 milhões de toneladas, sendo que a área de plantio totalizou 24,97 milhões de hectares, correspondendo a um acréscimo de 3,3% ou 791,2 mil hectares sobre safra 2010/2011, passando a ser a maior safra cultivada com soja no País (BRASIL, 2012).

A modernização da agricultura, através do pacote tecnológico adotado a partir da II Guerra Mundial, levou à adoção de práticas como a simplificação dos agroecossistemas através da implementação de sistemas de produção baseados na monocultura, sobreposição de ciclos naturais, mecanização intensiva, irrigações pesadas, adubações muitas vezes excessivas, especialmente através do uso de fertilizantes altamente solúveis e uso indiscriminado e massivo de agrotóxicos, portanto com alto aporte e dependência de insumos externos de alto custo. Embora essas práticas agrícolas tenham impulsionado a produção mundial de alimentos, efeitos negativos da adoção de tais práticas, tais como erosão, contaminação dos solos e mananciais, perda da diversidade da fauna e flora, ressurgimento de pragas e resistência de pragas aos agrotóxicos, começaram a ser percebidos (MENEZES, 2003).

Assim, a sustentabilidade, definida como sendo a capacidade da geração presente de suprir suas necessidades sem comprometer a capacidade de suprimento das necessidades das gerações futuras, passou a ser um dos grandes desafios da humanidade e, principalmente do setor primário, produtor de alimentos. Por outro lado, a sustentabilidade da sojicultura, do ponto de vista econômico e ambiental, vem sendo, nos últimos anos, constantemente ameaçada devido às intempéries climáticas, à elevada incidência de plantas daninhas, de insetos-praga e de doenças que até pouco tempo não causavam danos econômicos à cultura (LIMA et al., 2008).

Dentre as pragas da soja destaca-se, nas diferentes regiões produtoras, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), considerada um dos principais insetos-praga da cultura. Além do uso de agroquímicos, diferentes alternativas de controle são exploradas para viabilizar a manutenção de *A. gemmatalis* abaixo do nível de dano econômico.

Nesse contexto, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) torna-se uma ferramenta imprescindível para o sucesso no cultivo, pois seus princípios estão baseados na redução significativa no uso de agroquímicos a partir do monitoramento de infestações e no uso de alternativas mais sustentáveis para o controle de insetos-praga, como, por exemplo, o controle biológico. Esse método torna-se uma alternativa viável no controle de pragas agrícolas por ser de custo relativamente baixo e de menor risco à saúde humana e ao meio ambiente. Porém, se utilizado isoladamente, nem sempre é suficiente para reduzir a densidade populacional de pragas abaixo do nível de dano econômico, sendo às vezes necessário associá-lo a outras medidas de controle que não interfiram na atuação dos agentes de controle biológico e que mantenham uma boa condição sanitária da cultura (MENEZES, 2003).

O uso de agentes microbianos é uma tática utilizada dentro do controle biológico há bastante tempo, para o controle de diversos insetos-praga de importância econômica em variadas culturas. Dentre as suas principais vantagens estão a especificidade e a seletividade desses agentes de controle, a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais e a redução ou ausência de contaminação ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não-alvo (JÚNIOR, 2005).

Entre os microrganismos utilizados para o controle microbiano de pragas, destacam-se os fungos entomopatogênicos, cujo elevado potencial de utilização baseia-se, principalmente, na sua grande variabilidade genética, largo espectro de hospedeiros e a não necessidade de ingestão por parte dos insetos-praga que se deseja controlar, pois sua infecção é, geralmente, via tegumento, diferente de bactérias e vírus que a infecção é exclusivamente por ingestão (ALVES, 1998).

Apesar de seu grande potencial de utilização, os fungos entomopatogênicos são pouco utilizados na agricultura, devido, principalmente, à qualidade insatisfatória dos produtos que se encontram no mercado, no que diz respeito à pureza, à viabilidade e à eficácia do agente de controle. Os produtos à base de fungos são ainda produzidos, em sua grande maioria, de forma artesanal, mesmo em escala comercial (JÚNIOR, 2005).

Além disso, embora existam avanços científicos que permitem a produção de soja com menor agressão ao ambiente, verifica-se que grande parte dessas tecnologias sustentáveis não são adotadas pelos agricultores ou são adotadas de maneira isolada e/ou dissociadas, não causando o impacto positivo desejado (LIMA et al., 2008)

Apesar de ser verificada, em cultivos de soja, uma grande quantidade de lagartas-da-soja infectadas por fungos, no Brasil inexistem produtos comerciais à base desses microrganismos visando o controle de *A. gemmatilis*. Assim, o presente trabalho objetivou

realizar o isolamento de fungos de lagartas de *A. gemmatalis* contaminadas e avaliar o potencial patogênico das culturas fúngicas isoladas. Para *Aspergillus nomius*, que correspondeu ao fungo que ocasionou a maior porcentagem de mortalidade das lagartas expostas, foi verificada a capacidade de produção enzimática e a viabilidade de produção. Ainda, foi avaliada a patogenicidade e estabelecidas a CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> da melhor formulação obtida.

O fungo *A. nomius* é conhecido como uma espécie produtora de toxinas do tipo aflatoxinas, que além de possivelmente atuar na infecção de insetos por via respiratória, pode atingir de maneira tóxica outros organismos, até mesmos os seres humanos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura da soja

A soja, *Glycine max* (Linnaeus) Merrill, é uma leguminosa de alto valor nutricional, rica em óleo e proteínas, sendo uma fonte importante de divisas para vários países, inclusive o Brasil, que é o segundo maior país produtor, consumidor e exportador de soja, perdendo somente para os Estados Unidos (DE BORTOLI, 2005).

A cultura da soja, hoje cultivada em todo o mundo, é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem. Nos seus primórdios, era uma planta rasteira e habitava a costa leste da Ásia, principalmente a região norte da China. Sua evolução ocorreu de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China. Apesar de conhecida como um grão sagrado e explorada intensamente na dieta alimentar do Oriente há mais de cinco mil anos, o Ocidente ignorou o seu cultivo até a segunda década do século vinte, quando os Estados Unidos (EUA) iniciaram sua exploração comercial - primeiro como forrageira e, posteriormente, como grão (DALL'AGNOL, 2008).

A planta adaptou-se bem ao ambiente brasileiro, principalmente no que se refere às exigências hídricas, que chegam a ser de 7 a 8 mm.dia<sup>-1</sup> em períodos de floração e enchimento de grãos, e às exigências térmicas e fotoperiódicas, se adaptando bem a temperaturas entre 20 e 30°C. Com relação ao fotoperíodo, a soja é considerada uma planta de dia curto e, em função dessa característica, a faixa de adaptabilidade de cada cultivar varia à medida que se desloca em direção ao norte ou ao sul. Entretanto, cultivares que apresentam a característica de “período juvenil longo” possuem adaptabilidade mais ampla, possibilitando sua utilização em faixas mais abrangentes de latitudes (locais) e de épocas de semeadura (BRASIL, 2011).

A produção de soja no Brasil, na última safra encerrada (2011/2012), foi de 68,75 milhões de toneladas, inferior em 8,7% (6,58 milhões de toneladas) ao volume de 75,32 milhões de toneladas produzido em 2010/2011. Tal resultado se deve, exclusivamente, às condições climáticas adversas, caracterizadas por estiagens nos principais estados produtores da região sul do País. A área de plantio encerrada no mês de dezembro/11 totalizou 24,97 milhões de hectares, correspondendo a um acréscimo de 3,3% ou 791,2 mil hectares sobre a efetivada em 2010/2011, de 24,18 milhões de hectares, passando a ser a maior safra cultivada

com soja no País. Nessa safra, o Estado do Rio Grande do Sul atingiu o recorde de produtividade de 2.845 quilos.ha<sup>-1</sup> (BRASIL, 2012).

A área e a produção no Brasil deverão crescer substancialmente como consequência do incremento da demanda por carnes e biodiesel e da disponibilidade de mais de 100 milhões de hectares de terras aptas para a produção dessa oleaginosa, apenas no ecossistema do cerrado. A expectativa de crescimento da produção nacional e da demanda mundial pode ser creditada aos seguintes fatores: aumento da população humana, a qual consumirá mais soja, principalmente via consumo de carnes, produzidas a partir dos farelos de soja e de milho; aumento do poder aquisitivo da população urbana, destacadamente no continente asiático, onde está o maior contingente de potenciais consumidores da oleaginosa; substituição do farelo de carne, elaborado a partir de restos de carcaças bovinas; potencial de utilização da soja como matéria prima para a indústria de biodiesel, tintas, lubrificantes, plásticos, entre outros; crescente consumo de farelo de soja para alimentar a crescente indústria de carnes do Brasil; redução do protecionismo e dos subsídios à soja por parte dos países ricos; exoneração de parte dos pesados tributos incidentes sobre a cadeia produtiva da soja no Brasil, o que estimularia mais produção, porque incrementaria sua competitividade no mercado externo (DALL'AGNOL, 2008).

### **2.1.2 Insetos-praga da soja**

A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até a colheita. Como um único indivíduo, isoladamente, pode não produzir danos que compensem sua eliminação da lavoura, não é, então, considerado praga. Portanto, o termo praga depende da densidade populacional do organismo em questão. O conhecimento do impacto dos insetos no desenvolvimento e na produção da soja é essencial para um manejo satisfatório. Duas questões devem ser consideradas: como o inseto causa dano às plantas de soja e como a planta responde a este dano. A primeira questão requer a distinção dos diferentes danos de insetos e a segunda envolve o impacto fisiológico do dano (DEGRANDE & VIVAN, 2008).

Muitos outros fatores podem influenciar a resposta da planta ao dano. A parte atacada da planta é uma importante consideração. Os danos nas estruturas de produção das plantas como flores, vagens, grãos ou sementes apresentam efeitos mais severos e afetam mais a produção do que os danos em raízes ou folhas. Outro fator importante é a fase de

desenvolvimento da planta em que ocorre o dano. O ataque de pragas na fase de plântula pode ser mais severo do que na fase em que a planta está mais tolerante ao ataque e ainda possui um período para compensar o dano, como no caso de pragas desfolhadoras. Durante o estágio reprodutivo, período de formação de grãos e sementes, há menos oportunidade para as plantas compensarem o dano. Conseqüentemente, os danos durante o estágio reprodutivo apresentam maior efeito na produção quando comparado aos danos ocasionados nos outros estádios de desenvolvimento. Mortes de plantas que levem à redução do estande, normalmente contribuem para perdas elevadas de produtividade (DEGRANDE & VIVAN, 2008)

Logo após a germinação, a partir do início do estágio vegetativo, vários insetos como o bicudo-da-soja (*Sternechus subsignatus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae)), a lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)), os corós (Scarabaeoidea) e os percevejos-castanhos-da-raiz (*Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae) e *Atarsocoris brachiariae* Becker (Hemiptera: Cydnidae)) danificam a cultura. Mais adiante, a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae)), a lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae)) e vários outros desfolhadores atacam as plantas, ocorrendo em maior número durante as fases vegetativa e de floração (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Com o início da fase reprodutiva, surgem os percevejos sugadores de vagens e de sementes (*Nezara viridula* Linnaeus (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildinii* Westwood (Hemiptera: Pentatomidae) e *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae)), dentre outras espécies, que causam danos desde a formação das vagens até o final do enchimento dos grãos. A soja pode, também, ser atacada por outras espécies de insetos, consideradas pragas esporádicas, cujos aumentos populacionais são determinados por alterações climáticas, ou outros fatores, como, por exemplo, os sistemas de produção específicos de cada região (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Fundamentalmente, os percevejos da parte aérea e as lagartas desfolhadoras constituem as pragas-chave da cultura da soja. Por isso, qualquer programa de manejo deve ser previamente estruturado para controlá-los prioritariamente. O controle das demais espécies deve ser feito por ocasião das suas ocorrências significativas, detectadas nas amostragens de pré-safra, safra e pós-safra (DEGRANDE & VIVAN, 2008).

A lagarta-da-soja é o inseto desfolhador mais comum da soja no Brasil, sendo encontrada em todos os locais de cultivo. Costuma atacar as lavouras a partir de novembro, nas regiões ao norte do Paraná, e a partir de dezembro a janeiro no sul do país, podendo causar 100% de desfolhamento (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Essa lagarta já se

encontra registrada nas regiões produtoras de soja de todo o país, sendo seu desenvolvimento na cultura amplamente conhecido e divulgado pela literatura especializada (DE BORTOLI, 2011).

A coloração dos adultos de *A. gemmatalis* é muito variável (cinza, marrom, ou amarelado), assumindo diversas tonalidades (Figura 1). Durante o dia, esses insetos possuem vôo curto e irregular, pousando sobre a folhagem ou no solo. Durante o por do sol a movimentação é bastante reduzida, porém cerca de 30 minutos após o anoitecer o movimento assume características de regularidade. Quando em oviposição voam mais rapidamente, permanecendo perto das folhas das plantas. A oviposição inicia no primeiro dia após a cópula, ocorrendo durante todas as horas de escuridão, com o pico entre 21 e 23 horas, quando são colocados cerca de 50% dos ovos. A atividade é mais comum quando a temperatura diminui e a umidade relativa do ar aumenta, cessando quando há a formação de orvalho. Os ovos (Figura 2), de formato esférico, de coloração verde claro (tornando-se escuros com o tempo) e medindo cerca de 1,5mm, são depositados em todas as partes da planta, mas preferencialmente nas folhas, sendo difíceis de serem observados a olho nu (SILVA, 2000).



Figura 1 - Adulto de *Anticarsia gemmatalis*. Fonte: HOFFMANN-CAMPO et al., 2000.



Figura 2 - Ovos de *Anticarsia gemmatalis*. Fonte: HOFFMANN-CAMPO et al., 2000.

A eclosão das lagartas de *A. gemmatalis* ocorre entre três e sete dias após a oviposição. Logo após a eclosão, as lagartas medem 2,5 mm (primeiro ínstar). A cor da lagarta é verde claro, sem as listras que aparecerão posteriormente. As patas situadas nos segmentos abdominais quatro e sete são menores que as situadas nos segmentos cinco e seis e não são utilizadas para a movimentação. Em média, a duração desse ínstar é de dois dias (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

No segundo ínstar, com duração média de quatro dias, as lagartas desenvolvem-se até 9 mm, aparecendo as listras longitudinais, que se constitui na grande diferença em relação ao primeiro ínstar (SILVA, 2000). Nesses dois primeiros ínstares, locomovem-se medindo palmos, podendo ser confundidas com as lagartas falsas-medideiras e as lagartas raspam o parênquima foliar (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). As lagartas, inicialmente, apenas raspam pequenas áreas das folhas deixando para trás uma membrana translúcida e perfurações (MOREIRA et al., 2009).

No terceiro ínstar (Figura 3), a cápsula cefálica é mais retilínea, fortemente bilobada e amarelada. Os ocelos são pretos e o aparelho bucal marrom escuro. O corpo é cilíndrico e todas as patas são utilizadas para a movimentação. A lagarta se desenvolve até atingir 15 mm, sendo que a duração desse ínstar varia entre três a quatro dias (SILVA, 2000). Somente a partir do terceiro ínstar que as lagartas conseguem perfurar as folhas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Quando estão maiores (a partir do terceiro ínstar), alimentam-se de toda a superfície foliar, inclusive de nervuras, pecíolos e hastes mais finas. Nesse caso, as folhas atacadas ficam com grandes áreas recortadas ou são completamente consumidas (MOREIRA et al., 2009).



Figura 3 - Lagarta de *Anticarsia gemmatalis* de terceiro ínstar. Fonte: HOFFMANN-CAMPO et al., 2000.

A partir do quarto ínstar, as linhas dorsal, subdorsal e substigmatal tornam-se pronunciadas, sendo mais claras que o corpo, tendo as bordas escurecidas. Desenvolvem-se até atingirem 18 mm, permanecendo quatro dias nesse ínstar (SILVA, 2000).

Na lagarta de quinto ínstar as listras são mais claramente definidas. As papilas são brancas e na área entre as linhas dorsal e subdorsal, existem alguns pontos brancos simples, com uma borda marrom, sendo os mesmo duplos no metatórax. Podem atingir até 25 mm, com duração média de quatro dias (SILVA, 2000).

Atingindo o sexto ínstar, a lagarta pode desenvolver até 50 mm de comprimento, sendo que a duração do estágio pode variar entre cinco e vinte dias. A fase final desse estágio é chamada de pré-pupa, quando a lagarta praticamente cessa a alimentação. Nesse período, a lagarta encolhe até aproximadamente 25 mm, apresentando os segmentos bem pronunciados, com coloração rosada, sem a presença de linhas longitudinais (SILVA, 2000).

A fase de pupa (Figura 4) é passada no solo, a uma profundidade que pode atingir até cinco centímetros. A pupa tem um comprimento aproximado de 20 mm, sendo de coloração verde no primeiro dia, passando a marrom escuro brilhante posteriormente. A duração do período varia, sendo de sete dias no verão, podendo, entretanto, atingir até 50 dias se a temperatura for muito baixa (SILVA, 2000).



Figura 4 - Pupas de *Anticarsia gemmatalis*. Fonte: HOFFMANN-CAMPO et al., 2000.

Com relação aos danos ocasionados à cultura da soja, lagartas de terceiro ínstar já provocam perfurações nas folhas, mas deixam as nervuras centrais e laterais intactas. O

consumo foliar é muito pequeno nos três primeiros ínstares (lagartas até 10 mm). Do quarto ao sexto ínstar, as lagartas consomem mais de 95% do total de consumo foliar, que é de 100 a 120 cm<sup>2</sup> por lagarta. Em altas populações, se não controlado, esse inseto pode provocar desfolhas elevadas (> 30%), causando perdas de produtividade da cultura (SOSA-GÓMEZ et al., 2010).

## **2.2 Controle Biológico de Insetos-Praga**

O controle das principais pragas da soja deve ser feito com base nos princípios do “Manejo Integrado de Pragas” (MIP). Esse sistema de manejo consiste de tomadas de decisão de controle com base no nível de ataque, no número e tamanho dos insetos-praga e no estágio de desenvolvimento da soja, informações essas obtidas em inspeções regulares na lavoura com este fim (BRASIL, 2011).

O MIP é a integração de estratégias e táticas. A principal estratégia é a manutenção das populações das pragas abaixo dos níveis tolerados e que, dessa forma, não causam dano econômico. As táticas, por outro lado, se referem aos meios pelos quais a redução populacional das pragas é obtida dentro do contexto econômico, ecológico, toxicológico e social. Portanto as táticas definem os meios pelos quais o objetivo final (estratégia) será obtido (FERNANDES, 2000).

Com relação às táticas de controle, nos dias de hoje, em que se utiliza cada vez mais o MIP em direção a uma agricultura sustentável, o Controle Biológico assume importância cada vez maior. Primeiramente por ser um dos pilares de sustentação de qualquer programa, pois os inimigos naturais são os principais fatores de mortalidade no agroecossistema, com papel relevante na manutenção do equilíbrio de pragas. Em segundo lugar, aparece como uma importante medida de controle para manutenção das pragas em níveis populacionais toleráveis, ao lado de tantos outros métodos de controle, como culturais, físicos, de resistência de plantas a insetos, comportamentais (feromônios), que podem ser harmoniosamente integrados com métodos químicos (especialmente reguladores de crescimento e produtos de última geração, pouco agressivos ao meio ambiente) (PARRA, 2000).

Nesse sentido, considerando-se que cada espécie de inseto é suscetível a pelo menos um microrganismo patogênico, como ocorre com todos os outros organismos vivos dos diferentes reinos, ou seja, que pelo menos um microrganismo seja capaz de causar algum tipo

de doença a esse inseto, tem-se uma pequena noção da importância do estudo das doenças no contexto do controle de pragas (ALVES, 1998).

As principais vantagens do uso de microrganismos entomopatogênicos, ou seja, do controle microbiano, para o controle de pragas são a especificidade e a seletividade desses agentes de controle, bem como a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais e a ausência da poluição ambiental e toxicidade em homens e outros organismos não alvos (JÚNIOR, 2005).

Dentre os fatores bióticos relacionados ao entomopatógeno destacam-se: tipo de patógenos (primários, secundários, acidentais, ocasionais, facultativos, obrigatórios); infectividade (capacidade de penetração), patogenicidade (capacidade de provocar doença), virulência e agressividade; estratégia de reprodução do patógeno; disseminação e transmissão do patógeno; vias de inoculação dos patógenos; capacidade de sobrevivência; potencial de inóculo (número de propágulos viáveis); interações entre organismos, como sinergismo, antagonismo e coexistência (JÚNIOR, 2005).

Entre os fatores abióticos que precisam ser conhecidos para os estudos epizootiológicos, podem-se citar: temperatura (ideal na faixa entre 15 e 38°C); umidade (quantidade de chuva, umidade do solo e umidade do ar); radiação e fotoperíodo (principalmente com relação à faixa de UV); solo (condições limitantes de pH); e produtos fitossanitários (JÚNIOR, 2005).

Os principais agentes entomopatogênicos relacionados ao controle microbiano de insetos são fungos, bactérias, vírus e nematoides, com vários casos estudados e exemplos de utilização comercial (ALVES, 1998).

### **2.3 Fungos entomopatogênicos**

Entre os microrganismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico destacam-se os fungos filamentosos. Quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela sua penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo, assim, da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção (FRANCESCHINI et al., 2001).

Esses agentes foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. Aproximadamente 80% das doenças têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes a cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já relatados ocorre no Brasil, sendo que desses, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1998).

A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos. Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos (ALVES, 1998).

Os fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos aquáticos e fitófagos que vivem na parte aérea das plantas e no solo. Podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo essa característica desejável e muito peculiar desse grupo. Alguns são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados como outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral. Os principais tipos de propágulos produzidos pelos fungos são conídios, esporos, zoósporos, ascósporos, zigósporos, azigósporos (clamidósporos), esclerócios e esporodóquios. Os conídios e esporos dos fungos também possuem alta capacidade de disseminação horizontal, podendo ser levados pelos diferentes agentes de disseminação para locais muito distantes (ALVES, 1998)

O ciclo das relações fungo-hospedeiro descrito por Alves (1998) depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como das condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro e apresenta as fases de adesão, que ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto e visa a preparação para a penetração; de germinação, onde encontrando condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrição, o fungo germina sobre o inseto, produzindo um tubo germinativo; de formação de apressório, que ocorre na extremidade do tubo germinativo com a dilatação das hifas, formando uma estrutura denominada apressório; de formação de grampo de penetração, quando ocorre uma diferenciação da hifa, tornando-a mais fina e saliente, a qual teria a função de iniciar o processo de penetração da epicutícula e procutícula do tegumento do inseto; de penetração, que ocorre por dois processos principais, o físico, devido à pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas, e o químico, resultante da elaboração de enzimas (proteases, lipases e quitinases), as quais facilitam a penetração

mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo; de colonização, em que a hifa que penetra sofre um engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente na hemocele; de reprodução do patógeno, onde aparecem os sintomas iniciais da doença, como manchas escuras nas pernas, regiões intersegmentais ou distribuídas por todo o tegumento. O inseto cessa a alimentação, tornando-se fraco, apresenta sintomas de paralisia, perde a coordenação dos movimentos e fica desorientado. Após a morte do inseto, que ocorre normalmente de dois a oito dias da inoculação, as hifas começam a emergir pelos espiráculos e usando pressão mecânica saem através das áreas mais fracas (região intersegmentar) e depois pela cutícula mais grossa. O micélio cobre toda a superfície do corpo iniciando pelos espiráculos e áreas intersegmentais. Associado ao crescimento micelial ocorre, sob condições de temperatura e umidade favoráveis, a esporulação ou conidiogênese do fungo, que pode ser reconhecida por uma formação pulverulenta que recobre todo o corpo do inseto. A produção de conídios ocorre 24 a 48 horas após a emergência das hifas sob condições de elevada umidade e temperatura, na faixa de 20 a 30 °C, dependendo do patógeno. A morte ocorre devido à produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histológica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo, devido ao crescimento vegetativo e outros danos físicos, em decorrência do micélio e do início de esporulação do fungo. O cadáver apresenta, nessa fase, colorações variáveis conforme a espécie do fungo envolvida na doença; finalmente ocorre a disseminação do fungo, após a formação dos propágulos infectivos, estes se dispersam pelo ambiente, auxiliados pelos fatores bióticos e abióticos, tais como vento, chuva, homem, animais.

Em diversos países, vêm sendo utilizados fungos entomopatogênicos para o controle de diversos insetos-praga em cultivos agrícolas, dentre esses os lepidópteros, principalmente na fase de lagartas (Tabela 1). No Brasil, Pinto et al. (2006) destacam fungos como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Cordyceps barberi* Giard e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok para o controle da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae), na cultura da cana-de-açúcar, sendo *M. anisopliae* o mais utilizado e eficaz. Esse fungo é produzido por diversas usinas para ser utilizado no manejo integrado de pragas dessa cultura.

Na Costa Rica, *B. bassiana* vem sendo utilizado para o controle da broca-gigante *Telchin licus* Drury (Lepidoptera: Castniidae), também na cana-de-açúcar. Em menor escala, esse fungo também é aplicado na cultura para o controle das lagartas desfolhadoras *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) e *Mocis latipes* Guennée (Lepidoptera: Noctuidae) (ALVES et al., 2008a).

Specht et al. (2009) mencionam a ocorrência do fungo *Isaria javanica* (Frieder. & Bally) Samson & Hywell-Jones em lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera, Saturniidae). Os insetos representantes do gênero *Lonomia* destacam-se entre os lepidópteros de importância médica devido às suas lagartas serem capazes de produzir e inocular substâncias de ação urticante e de efeito hemorrágico em humanos; são responsáveis por acidentes graves em toda a região Neotropical com o registro de diversos óbitos .

Tabela 1- Alguns fungos entomopatogênicos que ocorrem em lepidópteros no Brasil.

<b>Fungo entomopatogênico</b>	<b>Praga controlada</b>
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Carposina nipponensis</i> Wals (Lepidoptera: Carposinidae) <i>Chilo partellus</i> Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) <i>Chilo suppressalis</i> Walker (Lepidoptera: Pyralidae) <i>Eldana saccharina</i> Walker (Lepidoptera: Pyralidae) <i>Lobesia botrana</i> Denis & Schiffermuller (Lepidoptera: Tortricidae) <i>Ostrina nubilalis</i> Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) <i>Scirpophaga incertulas</i> Walker (Lepidoptera: Pyralidae) <i>Sesamia inferens</i> Walker (Lepidoptera: Noctuidae)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>C. nipponensis</i> <i>C. partellus</i>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	<i>C. nipponensis</i>
<i>Fusarium sacchari</i>	<i>Leucinodes orbonalis</i> Guenée (Lepidoptera: Pyraustidae)
<i>Beauveria brongniartii</i>	<i>O. nubilalis</i>
<i>Nomuraea rileyi</i>	<i>C. nipponensis</i>

Fonte: PINTO et al., 2006.

Na Argentina, estudos de epizootiologia são realizados com o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson para antecipar epizootias naturais sobre *A. gemmatilis* na cultura da soja (ALVES et al., 2008a). No Brasil, o fungo *N. rileyi* também é utilizado em estudos relacionados a epizootias em *A. gemmatilis*, em muitos casos, complementando o controle iniciado com a utilização do vírus *Bacullovirus anticarsia*. Quando as condições são ideais para o fungo (temperatura entre 26 e 27°C e umidade relativa acima de 60%), pode-se esperar a ocorrência precoce da doença, dispensando as aplicações do vírus ou de produtos químicos (ALVES et al., 2008a).

Barros et al. (2000) destacam que *N. rileyi* ocorre em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera. Cerca de 90% dos hospedeiros desse fungo pertencem à ordem Lepidoptera, tendo como espécies importantes para a condição do Brasil, *A. gemmatilis*, *Cirphis latiuscula* H. Sch. (Lepidoptera: Noctuidae), *D. saccharalis*, *Plusia* sp. e *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).

As lagartas atacadas por *N. rileyi* (Figura 5) apresentam coloração branca, devido ao crescimento vegetativo do fungo, aspecto seco e mumificado, não apodrecendo como as lagartas mortas por baculovírus. Quando ocorrem condições de umidade apropriadas, o fungo esporula, passando da coloração branca à verde. Os esporos formados sobre as lagartas mortas se espalham pela ação do vento, infectando outras lagartas presentes na lavoura, multiplicando o patógeno. A ocorrência do fungo parece ser favorecida quando as plantas de soja fecham as linhas, criando um microclima favorável para o seu desenvolvimento. Assim, em semeaduras no início da época recomendada, a aparição do fungo é antecipada. Quando há previsão de períodos chuvosos, *N. rileyi* está presente na lavoura e as populações da lagarta-da-soja ainda não atingiram o nível de dano econômico, é conveniente monitorar a evolução da doença na população da lagarta para não realizar aplicações desnecessárias de produtos químicos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).



Figura 5 - *Anticarsia gemmatalis* contaminada com o fungo *Nomuraea rileyi*, antes da esporulação do fungo. Fonte: HOFFMANN-CAMPO et al., 2000.

*Nomuraea rileyi* também vem demonstrando eficiência de controle de outras espécies de insetos-praga. Alves et al. (2008a) mencionam que, em trabalhos realizados em Cuba, foram observados valores de eficiência de 75 a 85% para o controle de *S. frugiperda* no milho.

Entre os fungos menos conhecidos, mas de grande importância como agentes reguladores de populações de lagartas, podem ser mencionados: *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko que infecta lagartas de *P. includens*; e *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson que ataca a lagarta-da-soja e também as falsas-medideiras (subfamília Plusiinae). Na maior parte das vezes, *P. tenuipes* inicia o processo de infecção na lagarta e só ocasiona a morte na fase pupal. Assim, quando o ataque ocorre sobre a lagarta-da-soja, suas estruturas reprodutivas podem ser encontradas sobre a superfície do solo ou, quando infecta falsas-

medeiras, sobre as folhas. Apesar da baixa virulência, nos anos mais úmidos esse fungo pode controlar naturalmente um grande número de lagartas. Outro fungo importante no controle natural das populações de lagartas falsas-medeiras é *Pandora gammae* (Weiser) Humber (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Além das lagartas, outros insetos presentes em cultivos de soja são suscetíveis à infecção por fungos entomopatogênicos, como os coleópteros desfolhadores *Maecolaspis calcarifera* Bechyné (Chrysomelidae), *Aracanthus* sp. (Curculionidae) e *Diabrotica speciosa* (Germar) (Chrysomelidae), que podem ser encontrados dizimados pelo fungo *B. bassiana* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

As espécies dos percevejos-praga *E. heros*, *N. viridula*, *P. guildinii* e *S. castanea* podem também ser infectadas por *B. bassiana*, por *M. anisopliae* ou *P. fumosoroseus*. Entretanto, a incidência desses fungos é muito baixa, geralmente não atingindo 1% de incidência em populações naturais de percevejos. *P. fumosoroseus* também pode ocasionar epizootias em populações de moscas-brancas do gênero *Bemisia* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Sosa-Gómez et al. (2001) estudaram a ocorrência dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium*, *Beauveria* e *Paecilomyces* em condições de semeadura direta e convencional da soja. Foi determinada a densidade de unidades formadoras de colônia por g de solo e por cm<sup>2</sup> de folíolos de soja. Verificou-se que no solo sob semeadura direta ocorreu maior incidência dos entomopatógenos, mas sobre os folíolos essa diferença não ocorreu, proporcionando as mesmas possibilidades de infecção nos insetos suscetíveis da parte aérea que ocorrem nas duas condições de cultivo.

Um dos programas mais conhecidos e utilizados no Brasil se refere ao uso do fungo *M. anisopliae* para o controle de lagartas de *D. saccharalis* na cana-de-açúcar. Em trabalho de Zappellini et al. (2010), foram testados alguns isolados do fungo na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup> em lagartas com aproximadamente 1,5cm. As mortalidades variaram entre 54 e 100%, sendo que nove isolados foram capazes de produzir mortalidade superior a 80%.

No cultivo do tomate, um dos fatores limitantes da produtividade é a ocorrência de pragas, destacando-se, dentre elas, a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) praga chave nas principais regiões produtoras do Brasil. Pires et al. (2010) testaram isolados dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. Os dados obtidos mostraram que os isolados foram patogênicos para ambos os estágios de desenvolvimento testados e os ovos eram mais suscetíveis do que os primeiros ínstares larvais. Dois isolados *M. anisopliae* foram mais patogênicos para ovos e larvas. Os

autores também avaliaram a compatibilidade dos dois melhores isolados com diferentes grupos de inseticidas. O estudo sugere a utilização de enzimas do tipo esterase de *Aspergillus nomius* (Kurtzman, Horn and Hesseltine) como um biocatalisador, degradando resíduos de pesticidas químicos e favorecendo a atuação dos fungos entomopatogênicos.

A fim de obterem isolados nativos de fungos entomopatogênicos com patogenicidade contra *S. frugiperda*, a lagarta-do-cartucho-do-milho, em Durango, México, Garcia et al. (2011) avaliaram 97 isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Um isolado de *M. anisopliae*, obtido a partir das próprias larvas de *S. frugiperda* e avaliado contra larvas de segundo ínstar do mesmo inseto, apresentou a maior virulência, com 96,6% de mortalidade para uma concentração de  $1 \times 10^9$  esporos.mL<sup>-1</sup>. A CL<sub>50</sub> foi de  $5.92 \times 10^3$  esporos.mL<sup>-1</sup> e o tempo letal foi de 3,6 dias.

Os fungos, ao contrário das bactérias, vírus e protozoários entomopatogênicos, não necessitam ser ingeridos pelo hospedeiro para causarem infecções, bastando, para isso, que seus esporos penetrem diretamente através da cutícula dos insetos. Este processo pode ser aumentado pela produção de enzimas que degradam a cutícula. Estas enzimas, possivelmente relacionadas com a infectividade, talvez sejam determinantes na efetividade do processo (BARROS et al., 2000).

O tegumento dos insetos constitui-se em uma barreira físico-química altamente eficiente contra a penetração de muitos agentes entomopatogênicos. Este tegumento compreende a epicutícula e procutícula. A epicutícula é composta por lipídios (95%), aminoácidos e aminoaçúcares que servem como fonte de nutrientes para a germinação do fungo. Já na procutícula as proteínas são os componentes predominantes (61%), seguida de quitina (30%) e lipídios (7%). Enzimas extracelulares (endoproteases, aminopeptidases, lipases, esterases e quitinases) foram produzidas em grandes quantidades por *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *B. bassiana* e *V. lecanii* quando crescidos em cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). Uma protease purificada (Pr1) de *M. anisopliae* foi capaz de remover 25 a 30% das proteínas cuticulares, sugerindo que proteases estariam envolvidas na hidrólise da cutícula e facilitariam a penetração da hifa através da mesma. As quitinases, aparentemente possuem um papel menos significativo na penetração da cutícula comparado ao das proteases. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que as quitinases venham a desempenhar um papel importante na infecção considerando outros modelos de parasitismo (espécies fúngicas e hospedeiros diferentes) refletindo variabilidade tanto da estrutura cuticular de insetos quanto da capacidade de síntese de hidrolases por fungos entomopatogênicos (TIAGO & FURLANETO, 2003).

Assim, as enzimas atuam no processo de penetração dos fungos, inclusive na fase de adesão, antes mesmo da germinação dos conídios. São liberadas pelo tubo germinativo, o qual tem fundamental importância na produção dessas enzimas, que degradam a cutícula dos insetos, favorecendo o processo nutricional entre o fungo e o hospedeiro (ALVES, 1998).

As proteases, além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos esporos, têm funções nutricionais importantes, sendo capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em moléculas menores, que são absorvidas pelas células (ALVES, 1998).

Já as lipases são responsáveis pelo fracionamento dos lipídeos (óleos e gorduras) existentes na superfície dos insetos, para posterior metabolização pelos microrganismos (ALVES, 1998). As lipases são glicerol éster hidrolases que catalisam a quebra de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos. A lipase acontece exclusivamente na interface lipídeo-água, e a concentração de substrato é que determina a taxa de quebra. As lipases de origem microbiana são as mais versáteis e conseguem fazer um grande número de reações, como hidrólise, esterificação, alcoólise. O método Rodamina B evidencia microrganismos lipolíticos em razão da presença da enzima extracelular lipase (SILVA et al., 2010).

As quitinases, por sua vez, promovem a hidrólise da quitina dos insetos, a qual é feita por um sistema quitinolítico que envolve duas hidrolases (quitinase e quitobiase) que atuam sequencialmente (ALVES, 1998). Tem sido evidenciado que as quitinases têm um papel menor na penetração da cutícula, quando comparada com proteases, mas podem exercer uma função importante, dependendo da estrutura cuticular do inseto (BARROS et al., 2000).

Apesar da importância das enzimas no processo doença, torna-se difícil correlacionar a produção de enzimas em meios artificiais com a virulência dos fungos, já que a morte do inseto ocorre em função de uma complexa sequência de eventos (ALVES, 1998).

Nunes et al. (2010) avaliaram a produção de enzimas do tipo proteases (Pr1 e Pr2) do fungo *N. rileyi* em diferentes substratos, sendo que uma maior atividade foi verificada nos meios suplementados com a cutícula ou exúvia de *A. gemmatalis*. Nesse caso, a análise de correlação entre a atividade de Pr1 de uma das linhagens testadas e a mortalidade de *A. gemmatalis* sugere uma correlação positiva para essas variáveis.

## 2.4 Fungos produtores de micotoxinas

Os fungos são geralmente classificados, dentro da microbiologia, como secretores, já que normalmente secretam no ambiente que os envolve um grande número e uma grande quantidade de metabólitos. Os fungos como um todo são bem conhecidos pela produção de compostos quimicamente diversos, alguns dos quais são biologicamente muito potentes, causando reações adversas e severas em outros organismos. Somente uma pequena parte de fungos entomopatogênicos foi pesquisada em relação à produção de metabólitos diretamente tóxicos a seus hospedeiros ou que auxiliam os fungos no estabelecimento de infecções. No entanto, um número considerável de compostos já foi descrito. Esses compostos incluem enzimas de vários tipos e moléculas menores que são biologicamente ativas. As funções desses compostos na patogenicidade não são geralmente bem claras, mas incluem a dissolução da cutícula do inseto para a indução da doença, a supressão do sistema imunológico, a interferência com os canais de íons e outras funções celulares nos hospedeiros (ROBERTS & KRASNOFF, 1998).

Nos cultivos agrícolas existem aproximadamente 100 fungos encontrados no próprio campo de produção, ou em produtos alimentares armazenados, que são capazes de produzir micotoxinas, sendo que 20 espécies desses fungos são causadores de doenças em animais. Por estarem presentes em quase todos os lugares, os fungos produtores de micotoxinas são capazes de germinar, crescer e produzir toxinas em uma grande variedade de produtos agrícolas. Para que isso aconteça deve haver condições favoráveis de umidade, temperatura e aeração. Geralmente, as micotoxinas estão associadas a grãos armazenados e rações para alimentação de animais, especialmente milho com alto teor de umidade, em silagem, sementes de algodão, amendoim e soja (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Os produtos agrícolas estão constantemente sujeitos à contaminação fúngica, sendo que as principais espécies de fungos toxigênicos com capacidade de produzir micotoxinas são os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Em grãos e produtos processados de soja, as principais micotoxinas relatadas são: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), deoxinivalenol, nivalenol, ocratoxina A e zearalenona. As aflatoxinas e as ocratoxinas são produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, enquanto deoxinivalenol, nivalenol e zearalenona, pelos fungos do gênero *Fusarium* (OLIVEIRA, 2010).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais conhecidas e são produzidas, principalmente, pelos fungos *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare. A designação

“aflatoxinas” surgiu por terem sido isolados *A. flavus* e uma toxina produzida por esse fungo, a qual foi designada aflatoxina (toxina do *A. flavus*), a partir da ração que causou a morte de mais de 100 mil perus na Inglaterra. Posteriormente, foi verificado que *A. parasiticus*, *A. nomius* e outras espécies de *Aspergillus* também produzem aflatoxinas. A aflatoxina B1 (AFB1) é produzida por todas as linhagens produtoras de aflatoxinas, sendo considerada a mais potente (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

As micotoxinas são produzidas como metabólitos secundários. Os metabólitos primários dos fungos, assim como os de outros organismos, são aqueles essenciais ao crescimento. Já os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente para o crescimento e metabolismo do organismo produtor (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Oliveira et al. (2010) concluíram que grãos de soja, quando armazenados de forma correta, apresentam baixa ocorrência de micotoxinas. Entretanto, a grande fonte de contaminação por aflatoxina B1 e zearalenona são as impurezas e/ou matérias estranhas.

Por outro lado, Alves (1998) refere-se à possibilidade desse grupo de fungos produtores de micotoxinas estarem associados à patogenicidade em insetos.

Os fungos entomopatogênicos possuem a capacidade de sintetizar toxinas que são utilizadas no ciclo das relações patógeno-hospedeiro. São conhecidas toxinas produzidas por diversas espécies de fungos. A beauvericina é produzida por *B. bassiana* e as destruxinas são encontradas em *M. anisopliae*. As avermectinas são lactonasmacrocíclicas derivadas do fungo (não-patogênico) *Streptomyces avermectilis* Kim and Goodfellow e possuem elevada ação inseticida, acaricida e nematocida. Esses produtos atuam em baixa dosagem sobre as pragas e vêm se mostrando seletivos para fungos entomopatogênicos, como *Hirsutella thompsonii* Fischer e *Aschersonia aleyrodis* Webber (ALVES, 1998).

Fungos do gênero *Aspergillus* são geralmente encontrados sobre insetos na fase assexuada, sendo ascomiceto na forma perfeita (sexual). Apresentam conídios e conidióforos característicos (Figura 10), podendo crescer sobre um grande número de substratos em virtude de sua capacidade de produção de diferentes tipos de enzimas. Comumente são relatados como sendo agentes secundários no processo doença, com ocorrência comum sobre insetos moribundos, já colonizados por outros patógenos ou submetidos a diferentes tipos de estresse (ALVES, 1998).

A infecção de *Aspergillus* spp. via tegumento dos insetos só é possível nas espécies capazes de produzir quitinase. A contaminação via oral é mais comum e o inseto pode morrer antes da pupação. Porém Alves (1998) destaca que Garcia & Habib (1978) inocularam *A.*

*parasiticus* em lagartas de *S. frugiperda* por via oral e obtiveram mortalidade de adultos. A infecção por via respiratória também já foi constada em gafanhotos.

São relatadas como suscetíveis a *A. flavus* diversas espécies das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Isoptera. Dentre elas, são citadas a mosca doméstica, drosófila, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae), *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) e *Culex* spp. (Diptera: Culicidae) (ALVES, 1998). Senna-Nunes et al (2002) avaliaram, in vitro, a ação do fungo *A. flavus* em adultos de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera: Muscidae) e obtiveram mortalidade de até 100% dos insetos em sete dias de avaliação e com concentração de  $10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

Depois de serem isolados de operárias da formiga *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae), *Aspergillus ochraceus* Wilhelm foi testado no mesmo inseto e promoveu uma mortalidade de 100% em todas as concentrações utilizadas. A mais eficiente foi a concentração de  $10^9$  conídios.mL<sup>-1</sup> que, em 11 dias, apresentou 100% de mortalidade, sendo que com concentração de  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup> o tempo para atingir 100% de mortalidade foi aumentado para 25 dias (RIBEIRO et al., 2012).

Segundo Alves (1998), diversos tipos de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* também podem atuar via oral, matando ou afetando o desenvolvimento de diversas espécies de larvas de lepidópteros e dípteros.

Tessari & Cardoso (2012) mencionam aflatoxinas produzidas por fungos das espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* como sendo metabólitos secundários e podendo causar doenças respiratórias crônicas em aves.

Outro aspecto que deve ser destacado, referente a fungos do gênero *Aspergillus*, é que as aflatoxinas produzidas podem ser cancerígenas, hepatotóxicas, teratogênicas ou imunossupressoras. Em função disso, Muñoz et al. (2010) testaram algumas bactérias formadoras de ácido lático e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex Hansen) para bioproteção de alimentos contra o crescimento de *A. nomius*.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são encontrados em solos de clima temperado em regiões de todo o mundo. *Aspergillus flavus* e *A. nidulans* contêm um gene que codifica uma ação positiva e regula a transcrição de aflatoxinas, porém outros fatores também podem afetar a biossíntese de aflatoxinas, incluindo nitrogênio, umidade e pH do solo (EHRLICH et al., 2005). Nos alimentos, os principais fatores que determinam a deterioração pela ação dos fungos produtores de micotoxinas são a atividade de água, a concentração hidrogeniônica, a temperatura (processamento e estocagem), o potencial de oxirredução, a consistência, os nutrientes, o efeito específico do soluto e os preservativos (PEREIRA et al., 2002). As

aflatoxinas não parecem ser essenciais para o crescimento e vida do fungo. Algumas propostas para a função de aflatoxinas são: fornecem uma maneira de remover o excesso de carbono quando fungos crescem em fontes ricas em carbono; agem como sinais químicos entre espécies; estão envolvidas em processos de desenvolvimento de fungos; podem ser protetoras contra outros microrganismos do solo ou tóxicas a insetos. As aflatoxinas, por outro lado, não têm efeito fitotóxico, pois não são creditadas a elas fatores de virulência em vegetais (EHRLICH et al., 2005).

A natureza dos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia dependendo da estrutura química da toxina. O grau desses efeitos adversos não é somente determinado pela concentração da toxina presente no ambiente, alimentos e rações, mas também depende do tempo de exposição, da espécie animal, quantidade consumida, dieta, estado nutricional e sexo. Enquanto nos animais as perdas na produtividade, a redução no ganho de peso e a imunossupressão são as mais importantes características das micotoxicoses, nos humanos, os efeitos genotóxicos e o envolvimento de micotoxinas na etiologia de câncer têm recebido uma atenção maior. Baixos níveis de micotoxicoses em animais são relacionados à recusa de alimentos, redução na taxa de conversão dos alimentos, anemia, falhas na reprodução, prejuízo na resposta imune e dano renal. Se animais sensíveis consumirem regularmente entre 50 e 100 mg de AFB1 (aflatoxina B1) por kg de ração, o resultado pode ser câncer no fígado. Em animais velhos ou perfeitamente desenvolvidos, esses efeitos devem ser menores. Animais com deficiência de proteínas na dieta são mais sensíveis às aflatoxinas do que os que consomem uma ração bem balanceada. Os efeitos agudos são primeiramente observados como danos estruturais e funcionais no fígado, incluindo necrose celular, hemorragias, lesões, fibrose e cirrose. Adicionalmente, encefalopatia hepática, imunossupressão, infecções respiratórias, hemorragia gastrointestinal, anorexia e febre. Surto de aflatoxicoses foram observados em perus, patos, galinhas, porcos, gado, cães e trutas (MAIA & SIQUEIRA, 2007).

Apesar dos possíveis efeitos tóxicos que alguns fungos do gênero *Aspergillus* podem causar em seres humanos e em outros animais, através da produção de aflatoxinas, outras características desse gênero são interessantes ao meio ambiente. Estudo de Uchida et al. (2003) demonstra o potencial do fungo *A. nomius* em produzir enzimas do tipo esterases e atuar na biodegradação de compostos ricos em ligações de ésteres, como polímeros, solventes, produtos médicos e pesticidas em solos contaminados.

## 2.5 Produção de fungos entomopatogênicos

Formular um organismo entomopatogênico significa acrescentar a ele determinados compostos que melhorem o seu desempenho no campo, facilitem o manuseio e a aplicação, e, principalmente, permitam a armazenagem sob condições nas quais se minimize o custo, com perda mínima das qualidades do produto. A formulação de um produto microbiano tem, em geral, o mesmo objetivo proposto para os inseticidas químicos, ou seja, liberar ingrediente ativo em uma forma apropriada de uso, de fácil aplicação, com alta eficiência e baixo custo (JÚNIOR, 2009a).

Entre os diversos sistemas de produção são reconhecidos três níveis diferentes, com base no volume e destino da produção, sendo laboratorial ou experimental, artesanal e industrial. Métodos adequados a um nível de produção podem não ser adequados a outros níveis, devido ao custo de produção, utilização de mão-de-obra, produtividade potencial e outros fatores (JÚNIOR, 2009a).

Dependendo do tipo de propágulo desejado e da espécie a ser produzida, os fungos podem ser produzidos sobre meios artificiais por três processos ou métodos: fermentação submersa (meios líquidos ou semi-sólidos), meios sólidos e fermentação bifásica (meios líquidos para crescimento vegetativo + substratos sólidos para esporulação) (JÚNIOR, 2009a).

A utilização de meios sólidos é a forma mais comum na produção de fungos entomopatogênicos, inclusive em escala comercial, por não necessitar de tecnologias mais aprimoradas. Esse processo de produção vem sendo usado há alguns anos na produção de *M. anisopliae* para o controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil, em sistemas de laboratórios setoriais em usinas de açúcar. Basicamente, o crescimento e esporulação do fungo se dão sobre o substrato sólido, e, após o desenvolvimento, os conídios (unidades infectivas produzidas) são separados do meio por peneiramento e encaminhados para uso direto, ou formulados. A produção de fungos em meios sólidos pode ser feita por vários métodos. Um processo bem prático é a produção em sacos plásticos de polipropileno, no qual a matriz inicial do fungo (discos de micélio ou suspensão de esporos) é inoculada em nos sacos contendo arroz pré-cozido e autoclavado. O material é mantido em salas com condições controladas, em prateleiras, e, ao final do processo podem se separar por meio de peneiramento (JÚNIOR, 2009a).

Para a produção de conídios em larga escala, têm sido utilizados produtos vegetais de baixo custo, especialmente grãos de arroz. O arroz pré-cozido é colocado dentro de frascos de vidro, sacos de polipropileno ou bandejas autoclaváveis e autoclavado. Visando fornecer espaço e oxigênio para o fungo crescer, o substrato deve ocupar no máximo a metade do volume do recipiente. Após o resfriamento o meio é inoculado com conídios e, em seguida, incubado sob temperatura ambiente. O uso de sacos plásticos autoclaváveis é o método mais utilizado para a produção de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Após 10 a 15 dias de incubação, os sacos são abertos e seus conteúdos expostos ao ar ou fluxo de ar levemente aquecido por 24 horas, até ocorrer o secamento (LEITE et. al, 2003).

A adição de caseína em concentrações variando de 0,01 a 1%, e lactose de 1 a 3% na água para pré-cozimento do arroz permite um aumento na produção de conídios pelo método da bandeja de até quatro vezes para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. O fungo pode ser formulado em pó molhável através da moagem do organismo mais o substrato ou utilizando argilas como inertes (LEITE et. al, 2003).

O ponto mais crítico na padronização (formulação) de fungos entomopatogênicos refere-se ao modo de infecção, que é essencialmente por contato. Isso dificulta a determinação exata da quantidade de esporos realmente envolvidos no processo infeccioso, pois é difícil garantir a permanência da suspensão sobre o tegumento do inseto tratado, o que não ocorre com a infecção por via oral (comum para bactérias e vírus) que garante critérios mais precisos de avaliação. Os sistemas de produção de fungos entomopatogênicos também dificultam bastante a padronização do produto final, pois a produção no próprio hospedeiro ou em meio sólido nem sempre permite a obtenção de uma formulação homogênea, nem garante a manutenção da quantidade exata de esporos por unidade de peso do formulado (JÚNIOR, 2009b).

Alguns aspectos citados por Alves (1998) são relacionados à qualidade dos processos de manutenção, produção e formulação de um fungo entomopatogênico como: cuidados com o isolado mantido na produção com manutenção de um estoque do isolado em nitrogênio líquido ou freezer e renovação periódica do material da linha de produção; sanidade, com a certificação da inexistência de doenças fúngicas ou virais que possam atacar o patógeno; concentração de conídios no produto final, determinando esse parâmetro por contagem em câmara de Neubauer, de suspensões oriundas do produto final; viabilidade dos conídios, com o plaqueamento do fungo em placas de Petri com meio de cultura, efetuando-se leituras diretamente ao microscópio, anotando-se o número de conídios germinados, o que permite a determinação da porcentagem de germinação (viabilidade); pureza, que pode ser determinada

pela contagem de fungos contaminantes e colônias de bactérias; agressividade, medida em potência relativa através de bioensaios, utilizando-se o inseto para o qual o fungo será empregado, e um isolado padrão.

Ainda segundo Alves (1998), citando trabalho de Jenkins et al. (1998), encontra-se um dos únicos exemplos de tentativas de estabelecimento de padrões mínimos como recomendação de qualidade de uma formulação fúngica. Os autores definem que um produto fúngico com base em formulação do tipo pó molhável deve conter os seguintes parâmetros de qualidade: umidade abaixo de 5%, viabilidade maior que 90%, nível de microrganismos contaminantes menor que 0,002%, virulência com variação de até 0,5 dias em relação ao padrão inicialmente estabelecido, quantificação expressa em rótulo de 4 a  $5 \times 10^{10}$  conídios.g<sup>-1</sup> de formulação e mais de 99% das partículas da formulação menores que 6 micrômetros de diâmetro.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento de fungos entomopatogênicos

Lagartas de *A. gemmatalis* infectadas por fungos entomopatogênicos, observados devido ao estágio de mumificação dos insetos, foram coletadas em lavouras de soja situadas nos municípios de Santa Maria, Restinga Seca, Formigueiro e São Pedro do Sul, na Região Central do Estado do Rio Grande do Sul. As lagartas foram coletadas nas plantas, com pinça esterilizada com álcool 70% e depositadas em embalagens plásticas. Após, foram transportadas ao Laboratório de Interação Plantas-Microrganismos do Departamento de Biologia, do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria.

Para o isolamento dos fungos foi utilizado o método de plaqueamento, através do meio de cultura BDA (Batata Dextrose e Ágar). Esse meio foi preparado (Tabela 2) e esterilizado em autoclave vertical com temperatura de 121°C e pressão de 1 atm, por vinte minutos. O BDA é um meio generalista, ou seja, uma grande diversidade de fungos cresce neste tipo de meio de cultura, sendo um dos mais utilizados em trabalhos de laboratório para isolar alguns fungos de conhecido potencial entomopatogênico (LEITE et al., 2003). O meio preparado foi adicionado em placas de Petri previamente esterilizadas em autoclave nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

Tabela 2 - Composição e modo de preparo do meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar).

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Batata	200 g
Ágar	15 a 20 g
Dextrose	20 g
Água	1000 mL

**Modo de preparo:** Cozinhar a batata em 500 mL de água. Dissolver a dextrose e o ágar nos outros 500 mL de água. Misturar o caldo da batata cozida com o restante dos ingredientes. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Manter o pH próximo a 7.

O isolamento dos fungos observados nas lagartas foi realizado de duas maneiras: a primeira foi raspando a superfície das lagartas contaminadas com uma pinça esterilizada e introduzindo o micélio do fungo nos meios de cultura; a segunda foi inoculando, com auxílio de pinça esterilizada, fragmentos da lagarta contaminada no meio de cultura. As placas originadas foram incubadas em câmaras incubadoras tipo BOD, com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias de inoculação foi observado se houve desenvolvimento de fungos. As placas de Petri que apresentaram crescimento de fungos foram mantidas na BOD até que os fungos fossem utilizados nos experimentos. Já as placas onde não foi observado crescimento de fungos foram eliminadas. Em algumas placas observou-se o crescimento de mais de um tipo de fungo. Nesse caso, foi realizada uma repicagem, separando-se os fungos observados em placas de Petri distintas, mantendo-as em BOD nas mesmas condições citadas anteriormente.

### **3.2 Criação de lagartas de *Anticarsia gemmatalis***

Lagartas de *A. gemmatalis* foram criadas em laboratório para serem utilizadas em diferentes testes, utilizando-se dieta artificial, de composição conforme Parra (1998) (Tabela 3). As lagartas foram obtidas do Laboratório de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP). Os adultos foram colocados em gaiolas de oviposição, medindo 0,4 x 0,4 x 0,4m, feita com armação de plástico recoberta com tecido tipo tela (Figura 6). Para alimentação dos insetos adultos, foi fornecida uma solução de mel (1%) com água, embebida em algodão. Nessa gaiola, as mariposas realizavam a cópula e as fêmeas ovipositavam em papéis filtro colados nas paredes da gaiola. Ao observar-se a presença de um número significativo de ovos nos papéis filtro, esses eram recortados e transferidos para bandejas de plástico, medindo 30 x 40cm, com 8 cm de profundidade, recobertas com filme plástico e contendo porções de dieta artificial, para que, ao eclodirem, as lagartas já encontrassem alimento.

Tabela 3 - Composição e modo de preparo da dieta alimentar para a criação de *Anticarsia gemmatalis*.

<i>Ingrediente</i>	<i>Quantidade</i>
Água destilada	1800 mL
Ágar	34 g
Feijão	112 g
Germe de trigo	90 g
Caseína	45 g
Levedura de cerveja	56 g
Ácido ascórbico	55 g
Complexo vitamínico	13,5 mL
Tetraciclina	112 mg
Formaldeído 40%	5,4 mL
Nipagin	4,5 g
Ácido sórbico	2,7 g
Proteína de soja	45 g
<b>Composição do complexo vitamínico</b>	
Niacinamida	1 g
Pantotenato de cálcio	1 g
Tiamina	0,25 g
Riboflavina	0,50 g
Piridoxina	0,25 g
Ácido fólico	0,10 g
Biotina	0,02 mg
Vitamina B <sub>12</sub> (1000 mg.mL <sup>-1</sup> )	2 mL
<b>Modo de preparo:</b> Cozinhar o feijão até o seu amolecimento e após misturá-lo com os demais ingredientes em um liquidificador, exceto formaldeído e o ágar. Adicionar água e bater até triturar os ingredientes e homogeneizá-los. Dissolver o ágar separadamente e pós adicioná-lo à mistura, assim como o formaldeído. Distribuir nos recipientes plásticos de 100 mL.	

No presente trabalho, a definição do ínstar no qual se encontravam as lagartas seguiu o exposto por Silva (2000). Assim, após atingirem o segundo ínstar, as lagartas eram individualizadas em recipientes plásticos de 100mL contendo dieta artificial (Figura 7), que servia como base alimentar até a fase de pupa. Tanto a gaiola de oviposição quanto os potes contendo a dieta eram mantidos em sala climatizada, com temperatura de 25°C e umidade relativa aproximada de 60%. As lagartas eram mantidas na dieta até o terceiro ínstar, momento em que eram utilizadas nos experimentos. Algumas eram mantidas até a fase adulta nos potes com dieta, quando eram novamente postas na gaiola de oviposição, para a manutenção da criação.



Figura 6 - Vista frontal da gaiola de oviposição com adultos de *Anticarsia gemmatalis*.

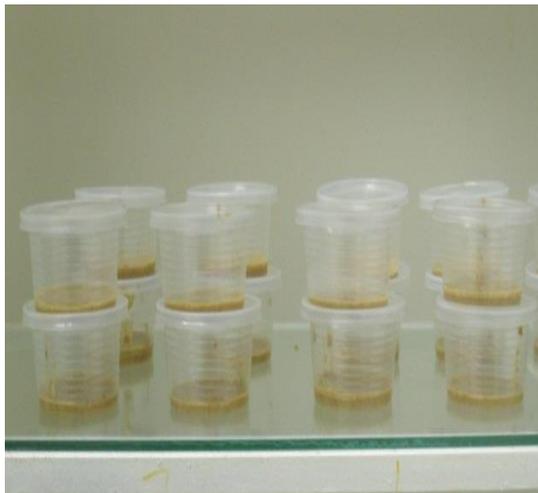


Figura 7 - Potes com dieta alimentar, utilizados na criação de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*.

### 3.3 Avaliação de virulência

Os testes de virulência foram realizados com adaptações das técnicas descritas por Alves et al. (1998). Em recipientes plásticos de 1L, lavados e esterilizados com hipoclorito 1% e álcool 70%, foram acondicionadas dez lagartas. O fundo dos recipientes foi coberto com

areia esterilizada, para evitar o excesso de líquido. Sobre essas lagartas, foram testados, individualmente, 20 fungos, isolados conforme descrito no item 3.1, sendo que cada fungo consistiu num tratamento. Um tratamento adicional foi realizado utilizando-se apenas água destilada e esterilizada sobre as lagartas, que serviu como testemunha no experimento, totalizando-se assim, 21 tratamentos. Foram realizadas cinco repetições, totalizando 50 lagartas por tratamento em um delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Para cada fungo isolado foi constituída uma suspensão de esporos, em câmara de fluxo laminar (ambiente asséptico), utilizando-se água destilada esterilizada. Os esporos dos fungos foram desprendidos do meio utilizando-se 10mL de água, uma gota de Twen<sup>®</sup> e através de uma alça de Drigalsky. As suspensões foram ajustadas para a concentração de  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, utilizando-se câmara de Neubauer.

Foram realizados dois tipos de inoculações dos fungos nas lagartas, que consistiram em diferentes ensaios. No primeiro ensaio, foram adicionados 0,5mL de cada suspensão de esporos dos fungos isolados em cada uma das lagartas de *A. gemmatalis*, de quarto ínstar, com o auxílio de uma micropipeta de 1mL graduada. No tratamento testemunha, utilizou-se 0,5 mL de água destilada e esterilizada. Em cada recipiente plástico contendo as dez lagartas, foi adicionado dieta alimentar (pote plástico com dieta, cortado ao meio) mantendo-se, assim, a nutrição normal das lagartas (Figura 8). Ao redor do pote menor contendo dieta, adicionou-se areia autoclavada a 121°C por 20 minutos, para que a areia absorvesse a umidade em excesso causada pela aplicação da suspensão de esporos sobre as lagartas. Os recipientes foram mantidos na mesma sala e condições utilizadas para a criação de *A. gemmatalis* e as avaliações relacionadas à observação da ocorrência de mumificação das lagartas foram realizadas durante dez dias.

O segundo ensaio foi desenvolvido com o mesmo delineamento experimental e mesma metodologia utilizados no ensaio anterior, porém com a diferença de que as lagartas, ao invés de receberem 0,5 mL de suspensão de esporos, foram, uma a uma, mergulhadas, por 5 segundos, na suspensão de esporos dos isolados fúngicos testados.



Figura 8 - Unidade experimental para avaliação de patogenicidade. Recipiente plástico de um litro com areia esterilizada no fundo e lagartas de *Anticarsia gemmatalis* sobre a dieta alimentar.

O fungo entomopatogênico que apresentou melhores resultados na mortalidade de *A. gemmatalis* foi encaminhado ao Instituto Biológico de São Paulo para identificação da espécie.

### **3.4 Avaliação semi-quantitativa de produção de enzimas**

Foram utilizados diferentes métodos para verificação da produção de lipases, quitinases e proteases, objetivando avaliar a capacidade de produção enzimática do fungo que ocasionou a maior porcentagem de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis*.

#### **3.4.1 Lipase**

Para avaliação das lipases foi utilizado o método Rodamina B, que evidencia microrganismos lipolíticos em razão da presença da enzima extracelular lipase. O meio de cultura utilizado para esse teste foi Luria Bertani (Tabela 4) (SILVA et al., 2010).

Tabela 4 - Ingredientes e modo de preparo do meio de cultura Luria Bertani, utilizado para a avaliação da produção de lipase de fungos entomopatogênicos.

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Cloreto de sódio	10 g
Extrato de levedura	5 g
Triptona bacteriológica	10 g
Óleo de oliva	25 g
Solução Rodamina B 0,001 %	10 mL
Água	1000 mL
Ágar	15 a 20 g

**Modo de preparo:** Dissolver os componentes do meio, exceto a solução Rodamina B e o óleo de oliva, em água destilada e autoclavar. Resfriar a 60 °C e adicionar o óleo de oliva estéril e a solução Rodamina B. Adicionar o meio em placas de Petri e conservar em geladeira.

O microrganismo foi inoculado por ponto, em placas de Petri (cinco) a 28 °C por 48 horas. Após esse período, o micélio formado foi submetido à luz UV (300 nm) e, caso apresentassem um halo de coloração laranja formado ao redor, seriam identificadas como microrganismo lipolítico, evidenciando a produção de lipase extracelular que degrada lipídeos.

Se houvesse atividade enzimática, essa seria determinada pela relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como o Índice Enzimático de Atividade (IEA) (SILVA et al., 2010):

$$IEA = \frac{\text{Diâmetro do halo descolorido (cm)}}{\text{Diâmetro da colônia (cm)}}$$

### 3.4.2 Protease

A habilidade de microrganismos em hidrolisar proteínas foi testada em meio contendo caseína como única fonte de carbono, conforme proposto por SILVA et al. (2010) (Tabela 5).

Tabela 5 - Ingredientes e modo de preparo do meio de cultura utilizado para a avaliação da produção de proteases de fungos entomopatogênicos.

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Caseína	1 %
Ágar	15 a 20 g
Água destilada	1000 mL

**Modo de preparo:** Dissolver os componentes do meio na água destilada e autoclavada. Verter o meio em placas de Petri e conservar em geladeira.

O meio de cultura foi vertido em cinco placas de Petri autoclavadas, sendo os micélios fúngicos adicionados aos meios e incubados por 72 h a 28°C. A formação de uma região transparente ao redor da colônia, em contraste com a superfície opaca do meio de cultura, demonstra se ocorre atividade proteolítica, a qual pode ser expressa utilizando-se a equação do Índice Enzimático de Atividade (IEA), descrita no item 3.4.1.

### 3.4.3 Quitinase

Para avaliar a produção de quitinase pelo fungo patogênico isolado, foi realizada a inoculação de um disco de micélio do microrganismo em meio de cultura contendo quitina como única fonte de nutrientes, conforme adaptado do que foi proposto por SILVA et al. (2010) (Tabela 6).

Tabela 6 - Ingredientes e modo de preparo do meio de cultura utilizado para a avaliação da produção de quitinase de fungos entomopatogênicos.

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Quitina de carapaça de caranguejo	1 %
Ágar	15 a 20 g
Água destilada	1000 mL

**Modo de preparo:** Dissolver os componentes do meio na água destilada e autoclavada. Verter o meio em placas de Petri e manter em geladeira.

As placas foram incubadas em BOD, a 28 °C por 72 h. Após esse período, a avaliação da produção de quitinase se deu pelo crescimento do fungo na placa e visualização de halo de inibição, indicativo de degradação da quitina que continha o meio. Em caso de verificação de formação de halo, a equação descrita no item 3.4.1 seria utilizada para a avaliação do Índice Enzimático de Atividade (IEA).

### **3.5 Produção do fungo entomopatogênico isolado**

O presente ensaio objetivou verificar a possibilidade e a viabilidade de se produzir o fungo isolado, visando uma possível estratégia industrial para posterior utilização no campo.

Foram introduzidos 200g de arroz descascado em oito sacos de polipropileno autoclaváveis de um litro de volume. Em quatro sacos foi adicionada água, numa quantidade equivalente a 25% do volume de arroz; em outros quatro sacos foi adicionada a quantidade de 50% do volume de arroz. Esse procedimento visou o pré-cozimento de arroz e a manutenção da umidade, sendo que o cozimento foi efetuado através da autoclavagem dos sacos, contendo arroz e água, a 121°C por 20 minutos. Em dois sacos com cada uma das quantidades de água mencionadas foi adicionado 10mL de uma suspensão de 1% de caseína..

Num dos sacos, de cada grupo de dois mencionados anteriormente (contendo 25% ou 50% de volume de água, com ou sem a adição de caseína) foi adicionada, com o auxílio de uma micropipeta graduada, 3 ou 6mL de suspensão de esporos do fungo isolado. Dessa forma, foram caracterizados oito dos tratamentos realizados. Ainda, foram realizados quatro tratamentos-testemunha, com 25% do volume de água, 50% do volume de água, além de cada volume acrescido de caseína (Tabela 7). Cada tratamento consistiu de três repetições.

Tabela 7 - Caracterização dos doze tratamentos realizados para a produção do fungo entomopatogênico isolado.

Tratamentos	Quantidade de suspensão de esporos
T1 - 25% do volume de água (50 mL)	3 mL
T2 - 50% do volume de água (50 mL)	6 mL
T3 - 50% do volume de água (100 mL)	3 mL
T4 - 50% do volume de água (100 mL)	6 mL
T5 - 25% do volume de água (50 mL) + caseína	3 mL
T6 - 25% do volume de água (50 mL) + caseína	6 mL
T7 - 50% do volume de água (100 mL) + caseína	3 mL
T8 - 50% do volume de água (100 mL) + caseína	6 mL
T9 - Testemunha 25% do volume de água	0
T10 - Testemunha 50% do volume de água	0
T11 - Testemunha 25% do volume de água + caseína	0
T12 - Testemunha 50% do volume de água + caseína	0

As suspensões de esporos foram preparadas adicionando-se 10mL de água destilada e autoclavada nas placas de Petri contendo o fungo e despreendendo-se o micélio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Foi realizada uma abertura nos sacos de arroz, com o auxílio de um bisturi esterilizado, para a introdução dos esporos do fungo. Os sacos foram fechados com fita adesiva, identificados e incubados em BOD, com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h (Figura 9). Nessas condições, observou-se, durante dez dias, se houve crescimento do fungo em cada um dos tratamentos descritos.



Figura 9 - Unidade experimental para avaliação de produção de *Aspergillus nomius*.

### 3.6 Virulência da melhor formulação obtida

O presente ensaio foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se o tratamento no qual houve melhor desenvolvimento do fungo no ensaio anterior causaria a mesma mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis* do que as suspensões de esporos obtidas diretamente do crescimento do fungo em placas de Petri com meio BDA. Dessa forma, seria possível definir a melhor maneira de se produzir o fungo, com relação ao substrato utilizado, quantidade de água e ausência ou presença de caseína no meio.

Assim, foi realizada a contagem de esporos dos tratamentos nos quais houve desenvolvimento do fungo no ensaio anterior. Para isso, colheu-se um grama do produto final, adicionou-se em 100mL de água destilada e autoclavada e uma gota de Twen<sup>®</sup> e levou-se a um agitador magnético por três minutos. Posteriormente, foi retirado 1mL dessa suspensão de esporos e realizada a contagem dos mesmos em câmara de Neubauer.

Com os produtos finais obtidos, foi realizado um novo teste de patogenicidade em lagartas de *A. gemmatalis*, com aquele tratamento que se obteve uma maior concentração de conídios/mL. O teste de patogenicidade se deu da mesma maneira descrita no Item 3.3, testando, nas lagartas, as duas formas de inoculação da suspensão de esporos mencionadas. Da mesma forma, foi realizado um tratamento-testemunha para cada forma de inoculação, utilizando apenas água destilada e autoclavada sobre as lagartas. Foram realizadas cinco repetições, com dez lagartas por recipiente, totalizando 50 lagartas avaliadas em cada um dos três tratamentos. Os recipientes foram mantidos na mesma sala e condições utilizadas para a criação de *A. gemmatalis* e foi avaliada, durante dez dias, a ocorrência ou não de mumificação nas lagartas.

Ainda, foi realizado o cálculo a  $CL_{50}$  a partir de diferentes dosagens do tratamento que resultou numa maior concentração de conídios/mL. Os testes foram realizados da mesma forma daqueles descritos no item 3.3 e as diferentes dosagens utilizadas são apresentadas na Tabela 8 e foram realizadas cinco repetições com dez lagartas em cada repetição, totalizando 50 lagartas por tratamento. No tratamento-testemunha foi utilizado 0,4mL de água destilada e autoclavada por lagarta. Os recipientes foram mantidos na mesma sala e condições utilizadas para a criação de *A. gemmatalis* e foi avaliada, durante dez dias, a ocorrência ou não de mumificação nas lagartas.

Tabela 8 - Diferentes dosagens do composto em que se obteve o melhor crescimento de fungo entomopatogênico, testadas em lagartas de *Anticarsia gemmatalis*.

<b>Dosagem testada</b>	<b>Número total de insetos expostos</b>
0,4 mL de água destilada e autoclavada.lagarta <sup>-1</sup>	50
0,1 mL.lagarta <sup>-1</sup>	50
0,2 mL.lagarta <sup>-1</sup>	50
0,4 mL.lagarta <sup>-1</sup>	50
0,8 mL.lagarta <sup>-1</sup>	50

### 3.7 Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Foi realizada a análise da variância e as médias comparadas através do Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Para estimativa das concentrações letais (mL.lagarta<sup>-1</sup>) foi utilizado um modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo de gompit), utilizando-se o *Probit Procedure* do software SAS versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 2012).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Fungos isolado e análise de virulência em *Anticarsia gemmatalis*

Foram isolados visualmente 20 fungos (Figura 10), morfologicamente diferentes, das lagartas de *A. gemmatalis* coletadas em lavouras soja da Região Central do Estado do Rio Grande do Sul. Esses organismos apresentavam coloração e estruturas distintas e foram utilizados nos testes de patogenicidade como possíveis organismos entomopatogênicos.

Porém, o aspecto visual das lagartas mumificadas era semelhante, aparentando todas estarem infectadas por *N. rileyi*, segundo descrições de Alves et al. (1998a) e imagens obtidas virtualmente (Figura 10).



Figura 10 - Lagartas de *Anticarsia gemmatalis* coletadas em lavouras de soja da região do Rio Grande do Sul, contaminadas com fungos entomopatogênicos.

Os 20 fungos isolados (Figura 11) foram aplicados em lagartas de *A. gemmatalis*, sendo que um deles resultou em 94% de mortalidade nos insetos, quando aplicado 0,5 mL.lagarta<sup>-1</sup> da suspensão de esporos (Tabela 9), e 96% quando as lagartas foram imergidas na suspensão de esporos do fungo (Tabela 10).

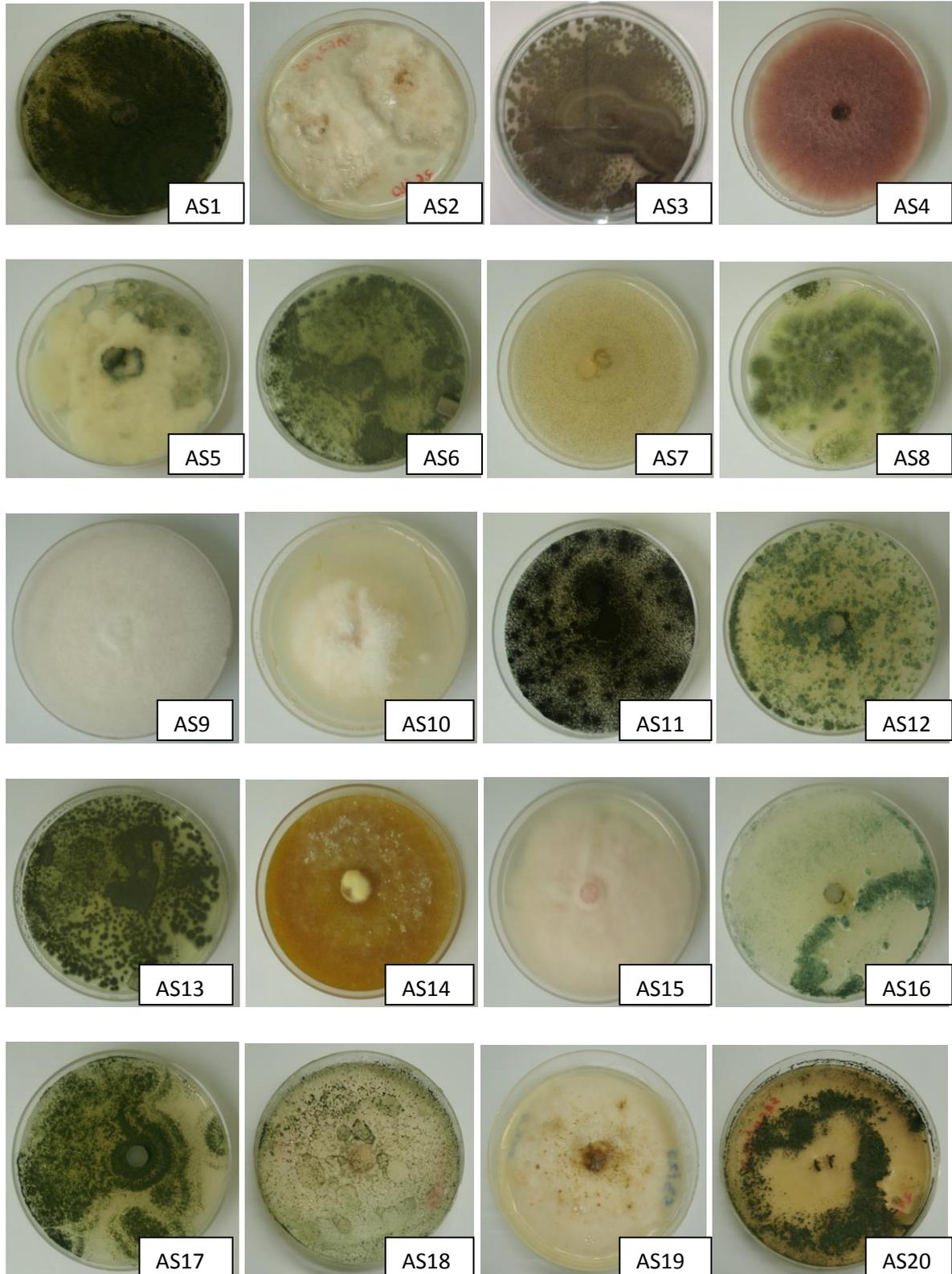


Figura 11 - Fungos isolados em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, incubados em BOD com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

Tabela 9 - Avaliação de virulência de 20 fungos isolados (AS1 a AS20), através da inoculação de 0,5 mL de suspensão de esporos, e do tratamento testemunha (água destilada e esterilizada) (T) sobre lagartas de quarto ínstar de *Anticarsia gemmatalis* (n= 50). Temperatura de 25°C e umidade relativa aproximada de 60%.

Tratamento	Lagartas mortas		Lagartas mumificadas	
	Total	Porcentagem	Total	Porcentagem
AS1	4 b*	8	0	0
AS2	6 b	12	0	0
AS3	5 b	10	0	0
AS4	6 b	12	0	0
AS5	5 b	10	0	0
AS6	4 b	8	0	0
AS7	6 b	12	0	0
AS8	3 b	6	0	0
AS9	6 b	12	0	0
AS10	4 b	8	0	0
AS11	3 b	6	0	0
AS12	47 a	94	47	94
AS13	3 b	6	0	0
AS14	4 b	8	0	0
AS15	6 b	12	0	0
AS16	2 b	4	0	0
AS17	3 b	6	0	0
AS18	6 b	12	0	0
AS19	3 b	6	0	0
AS20	5 b	10	0	0
T	4 b	8	0	0

\* Valores seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa através do Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tabela 10 - Avaliação de virulência de 20 fungos isolados (AS1 a AS20), através da imersão das lagartas em suspensão de esporos. n= 50. Temperatura de 25°C e umidade relativa aproximada de 60%.

Tratamento	Lagartas mortas		Lagartas mumificadas	
	Total	Porcentagem	Total	Porcentagem
AS1	5 b*	10	0	0
AS2	3 b	6	0	0
AS3	6 b	12	0	0
AS4	4 b	8	0	0
AS5	4 b	8	0	0
AS6	3 b	6	0	0
AS7	5 b	10	0	0
AS8	5 b	20	0	0
AS9	3 b	6	0	0
AS10	6 b	12	0	0
AS11	6 b	12	0	0
AS12	48 a	96	48	96
AS13	4 b	8	0	0
AS14	4 b	8	0	0
AS15	5 b	10	0	0
AS16	3 b	6	0	0
AS17	2 b	4	0	0
AS18	4 b	8	0	0
AS19	3 b	6	0	0
AS20	3 b	6	0	0
T	5 b	10	0	0

\*Valores seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa através do Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados observados nas Tabelas 1 e 2 demonstram que, independente da forma de inoculação dos fungos nas lagartas, o fungo entomopatogênico identificado como isolado AS12 resultou em elevado nível de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis*, comparando-se com os demais isolados. Esse fato fica evidenciado quando se observa que o único tratamento que demonstrou estágio de mumificação nas lagartas (sinal de que essas foram mortas pelo fungo) foi o do isolado mencionado (Figura 12). Na maioria dos demais tratamentos,

incluindo o tratamento-testemunha, a porcentagem de mortalidade foi em torno de 10%, nível considerado normal segundo Alves (1998). Exceto no tratamento AS12, as mortes ocorreram devido a outros fatores (possivelmente bactérias, vírus ou até mesmo morte natural), pois não foi observado estágio de mumificação nessas lagartas. O fungo AS12, observado nas lagartas mumificadas durante o experimento, foi novamente isolado das lagartas mortas no experimento e apresentou as mesmas características do fungo aplicado sobre as lagartas, ou seja, confirmou-se assim, se tratar do mesmo fungo.

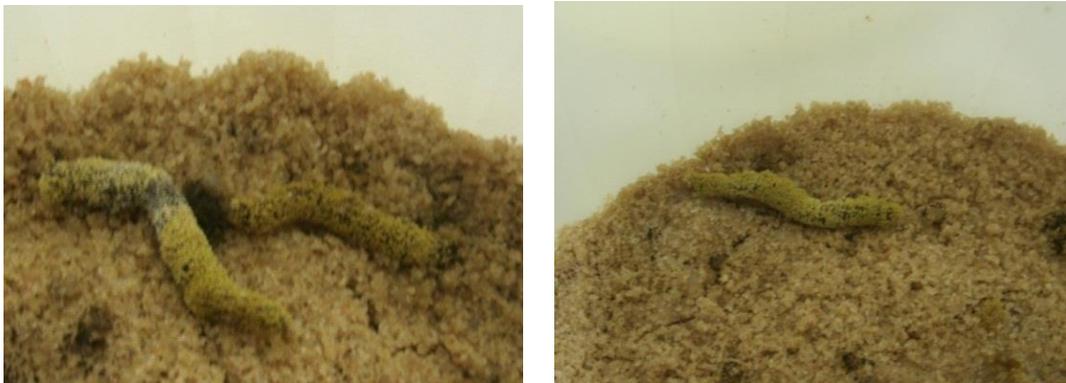


Figura 12 - Lagartas de *Anticarsia gemmatalis* mortas por *Aspergillus nomius* no tratamento AS12, apresentando estágio de mumificação. Temperatura de 25°C e umidade relativa aproximada de 60%.

Amostras do isolado AS12 foram enviadas para o Instituto Biológico de São Paulo, visando a identificação da espécie do fungo através de extração de DNA, amplificação de parte do gene codificador da beta-tubulina por PCR e posterior sequenciamento. Obteve-se, após a comparação da sequência do gene codificador da beta-tubulina com sequências depositadas no GenBank, que o isolado fúngico se tratava da espécie *Aspergillus nomius* (Figura 13).

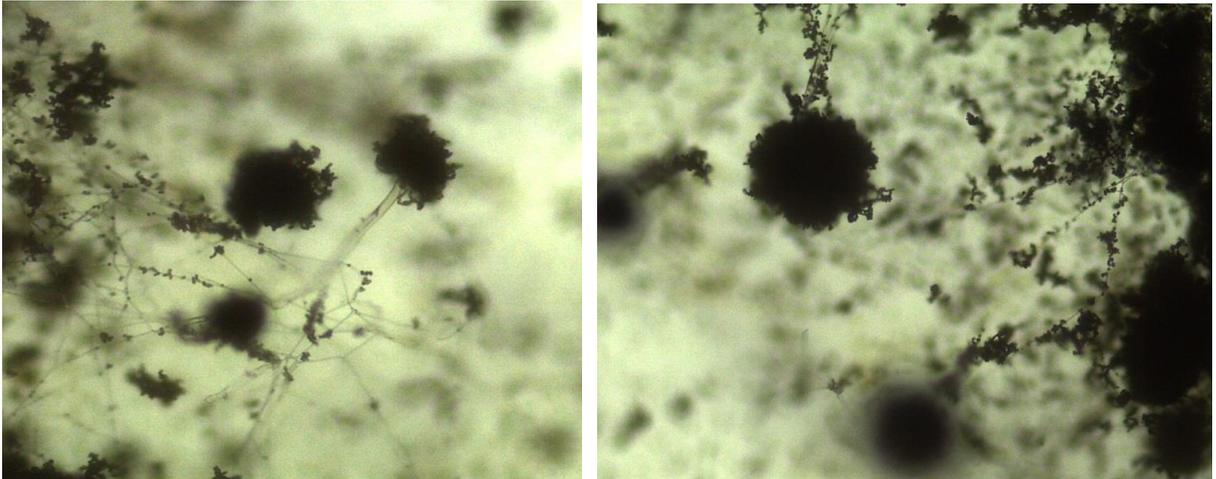


Figura 13 - Imagens microscópicas das estruturas (hifas e conióforos) de *Aspergillus nomius* obtidas no Laboratório de Interação Plantas-Microrganismos da Universidade Federal de Santa Maria (aumento 40 vezes).

Apesar do aspecto das lagartas mumificadas ser semelhante a infecções causadas por *N. rileyi*, a identificação do isolado AS12 não apontou como o fungo sendo pertencente a essa espécie. Ainda, era de se esperar a ocorrência de *N. rileyi*, visto ser uma das espécies mais comuns de fungos entomopatogênicos que ocorrem sobre *A. gemmatilis*. Apesar de o meio de cultura utilizado também ser indicado para o desenvolvimento dessa espécie, talvez outro meio devesse ter sido utilizado, como o Sabouraud Maltose Ágar com Extrato de Levedura (SMAY-modificado), mais específico para o crescimento de *N. rileyi* (LEITE et al., 2003). Outra possibilidade é que o fungo *N. rileyi* estivesse entre os isolados, porém nas condições do experimento, com relação a temperatura, umidade e estágio de desenvolvimento larval dos insetos não foi capaz de infectar ou demonstrar estágio de mumificação antes das lagartas entrarem em estágio de pupa.

O gênero *Aspergillus* apresenta algumas espécies que são patogênicas a insetos, mas também tem membros que são patogênicos a vertebrados. *A. flavus* e *A. ochraceus* têm sido considerados para uso como entomopatógenos, porém a utilização desses fungos não vem sendo proposta devido a problemas de segurança. Infecções por *Aspergillus* em pássaros, outros animais e seres humanos têm sido amplamente divulgadas (PEREIRA et al., 1998).

Gama et al. (2006) identificaram fungos do gênero *Aspergillus* associados à cutícula (2,9%), aparelho bucal (4,5%) e protórax (8%) da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae).

De acordo com Alexandre et al. (2006), os efeitos dos fatores físicos e bióticos na conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres de *Cerotoma arcuata* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) foram avaliados por Fernandes et al. (1989), mostrando que a mesma não ocorreu a 30°C pela presença de outros microrganismos no cadáver, especialmente bactérias e fungos contaminantes, como *Aspergillus* sp., que, favorecidos pelas temperaturas mais altas, colonizaram o hospedeiro mais rapidamente que *B. bassiana*. Dessa forma, o fungo entomopatogênico pôde infectar e matar o inseto, mas seu desenvolvimento micelial e a conidiogênese foram inibidos por antagonismo com contaminantes, principalmente quando as condições de temperatura foram desfavoráveis ao entomopatógeno. No presente trabalho, também se observou em muitos cadáveres a presença de *Aspergillus* sp., o que provavelmente afetou a produção de conídios nos insetos incubados a 32°C.

Desse modo, é possível, mesmo que a contaminação da lagarta de *A. gemmatilis* tivesse ocorrido pelo fungo *N. rileyi*, pelo menos aparentemente, que fungo *A. nomius* pudesse estar associado a essa infecção e esporulado por encontrar condições mais favoráveis no ambiente.

Não foi encontrada citação, em bibliografia especializada, que refira a presença da espécie *A. nomius* como entomopatogênico a lagartas de *A. gemmatilis*. Em relação a *A. flavus*, Alves (1998) refere-se apenas à mosca doméstica, drosófila, *B. mori*, *A. mellifera* e *Culex* spp. como sendo suscetíveis a esse fungo. Também Senna-Nunes et al (2002) mencionam a presença de *A. flavus* em adultos de *Musca domestica*. Já *Aspergillus ochraceus* foi isolado a partir de operárias de *A. bisphaerica* (RIBEIRO et. al, 2012). De acordo com Bittencourt (2000) o fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius causou mortalidade em colônias laboratoriais dos carrapatos *Hyalomma scupense* Schulze (1918) e *Dermacentor marginatus* Sulzer (1776). O fungo *Aspergillus niger* promoveu em média de 50% a inibição da postura do carrapato *Boophilus microplus* Canestrini (1887) e em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* Latrielle (1806), observou-se a infecção natural com o fungo *A. ochraceus*, que impediu a oviposição. Nesse último caso, através de estudos histopatológicos e de microscopia eletrônica de transmissão, deduz-se que *A. ochraceus* colonizou o carrapato via ânus e, posteriormente, intestino e tubos de Malpighi (BITTENCOURT, 2000).

Organismos desse gênero são particularmente agressivos como invasores secundários que ocorrem após condições debilitantes e prolongada terapia com antibióticos, porém, em alguns casos, *Aspergillus* sp. pode ser patógeno primário. *Aspergillus* é a segunda micose oportunista mais comum entre seres humanos com doença, chegando a 30% dos casos. *A. ochraceus* produz uma toxina (ocratoxina) que é nefrotóxica a muitos mamíferos, enquanto

que *A. flavus* produz aflatoxina que causa hepatite tóxica e neoplasia hepática em mamíferos. Por isso, tem sido sugerido que, devido à patogenicidade e toxicidade de fungos do gênero *Aspergillus* aos mamíferos, eles devem ser evitados como agentes de controle biológico (PEREIRA et al., 1998).

Gloer et al. (1989) isolaram a substância nominine, de *A. nomius*, e verificaram um alto poder inseticida para *Heliothis zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae). Essa substância é um diterpeno e foi isolado como maior componente orgânico solúvel dos escleródios de *A. nomius*.

Em estudo de Chouvenec et al. (2011) é relatado o uso de fungos do gênero *Aspergillus* para o controle biológico de cupins, destacando-se as espécies *A. flavus*, entomopatogênico à *Reticulitermes* sp. e *A. nomius* como um saprófita de *Coptotermes gestroi* Wasmann (1896).

Nos cultivos agrícolas existem aproximadamente 100 fungos encontrados no próprio campo de produção. Para que ocorra infecção, levando a danos severos, os fungos patogênicos devem encontrar condições favoráveis de umidade, temperatura e aeração (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Dentre os fungos que atacam a cultura da soja e que podem causar dano, de acordo com Brasil (2011), fungos do gênero *Aspergillus* não atuam como patógenos da cultura.

#### **4.2 Avaliação de produção de enzimas por *Aspergillus nomius***

Não se observou o crescimento do fungo *A. nomius* em meios de cultura ricos em quitina e lipídios, demonstrando que esse fungo não é um potencial produtor dessas enzimas. Porém, houve crescimento em meio contendo proteína, podendo-se afirmar que o fungo é um produtor de enzimas do tipo proteases (Figura 14). Apesar de ocorrer crescimento do micélio em meio contendo proteína, não foi possível a visualização de halo de inibição, devido ao crescimento uniforme do fungo em toda a placa. Assim, não foi possível realizar os cálculos para se obter o Índice Enzimático de Atividade (IEA) do fungo para a enzima em questão.

A produção de proteases, juntamente com a possível produção de toxinas do tipo aflatoxinas pelo fungo, podem estar relacionadas com a capacidade de *A. nomius* infectar o hospedeiro.



Figura 14 - Crescimento de *Aspergillus nomius* em meio de cultura rico em proteínas. Temperatura 25°C, fotoperíodo de 12 horas.

Schrank & Vainstein (2010) descrevem várias enzimas produzidas por *M. anisopliae* com as proteases: subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2), as proteases de cisteína (Pr4) e metaloproteases. Além disso, relatam que, pelo menos 14 proteases isomorfas são detectadas durante o crescimento em insetos. Em particular, a protease Pr1A tem sido implicada à entomopatogenicidade. Além disso, os mutantes para essa protease específica são menos virulentos, dependendo do hospedeiro infectado. Isto sugere uma possível regulação na patogenicidade, dependente da secreção de protease.

O fato de se observar o crescimento do fungo *A. nomius* em meio de cultura rico em proteína, aliado ao fato desse fungo causar considerável mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis*, sugere que enzimas do tipo proteases, como as mencionadas por Schrank & Vainstein (2010), podem estar envolvidas no processo de infecção dos insetos, principalmente no que se refere à penetração do fungo no inseto.

#### 4.3 Produção de *Aspergillus nomius*

Para avaliar a viabilidade de produção do fungo entomopatogênico *A. nomius*, utilizou-se um método muito utilizado por diversos laboratórios de pesquisa e pequenas empresas que produzem fungos entomopatogênicos. Trata-se da inoculação de suspensão de esporos em substrato alternativo, nesse caso e como na maioria dos casos relatados na

literatura, em arroz esterilizado. Variou-se o volume de água para cozimento do arroz, as quantidades (mL) de suspensão de esporos utilizadas e a adição ou não de caseína no meio.

A partir dos resultados obtidos, percebe-se semelhança nos resultados com relação à concentração de conídios por mL nos tratamentos realizados, sendo que a maioria ficou na casa de  $10^{10}$  conídios.mL<sup>-1</sup> (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentração média (conídios.mL<sup>-1</sup>) de esporos de *Aspergillus nomius* tendo como substrato arroz pré-cozido e autoclavado em diferentes volumes de água para cozimento do arroz e quantidades (mL) de suspensão de esporos, com adição ou não de caseína no meio. Temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Tratamento	Suspensão de esporos inoculada	Concentração média observada (conídios.mL <sup>-1</sup> )
T1 - 25 % do volume de água (50 mL)	3 mL	$1,22 \times 10^{10}$
T2 - 50 % do volume de água (50 mL)	6 mL	$1,93 \times 10^{10}$
T3 - 50 % do volume de água (100 mL)	3 mL	$1,55 \times 10^{10}$
T4 - 50 % do volume de água (100 mL)	6 mL	$2,42 \times 10^{10}$
T5 - 25 % do volume de água (50 mL) + caseína	3 mL	$2,30 \times 10^{10}$
T6 - 25 % do volume de água (50 mL) + caseína	6 mL	$2,88 \times 10^{10}$
T7 - 50 % do volume de água (100 mL) + caseína	3 mL	$2,23 \times 10^9$
T8 - 50 % do volume de água (100 mL) + caseína	6 mL	$6,75 \times 10^9$
T9 - Testemunha 25 % do volume de água	0	0
T10 - Testemunha 50 % do volume de água	0	0
T11 - Testemunha 25 % do volume de água + caseína	0	0
T12 - Testemunha 50 % do volume de água + caseína	0	0

Visualmente, percebeu-se que no tratamento em que houve  $2,88 \times 10^{10}$  conídios.mL<sup>-1</sup> (T6) o arroz ficou mais solto e, com isso, mais aerado, o que pode ter resultado numa tendência de melhor desenvolvimento do fungo. Já no tratamento com caseína e com 50% de concentração de água (T7) percebeu-se que o arroz ficou entumecido e com baixa oxigenação no meio.

Na América Latina são usados diversos bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. Os principais produtos utilizados são elaborados com os fungos *B. bassiana* (33%), *M. anisopliae* (32%), *Lecanicillium* sp. (14%), *N. rileyi* (6%), *Serratia insectorum* (3%), *Isaria fumosorosea* (3%), *Erynia virulenta* (3%) e mistura de diferentes fungos (6%). As pequenas empresas são responsáveis pela produção de 50% desses produtos. O restante é elaborado principalmente por centros de pesquisa e universidades do setor público (ALVES et al., 2008b).

A característica biológica da maioria dos fungos entomopatogênicos de se desenvolver em meios artificiais tem sido também bem explorada para a produção em larga escala. Estão envolvidos diversos métodos para a produção de fungos, contudo a produção em meios sólidos é certamente a mais utilizada na América Latina. Nesse caso, são usados substratos orgânicos ricos em amido, geralmente grãos, que facilitam a obtenção de conídios, estrutura infectiva usada nas aplicações. A fermentação sólida tem sido a preferida, não só pelo bom rendimento e simplicidade, mas também por exigir menor investimento inicial, em comparação com outros métodos de fermentação (ALVES et al., 2008b).

Muitos dos bioprodutos à base de fungos na América Latina não se apresentam formulados e as formulações existentes ainda são artesanais. A maioria dessas formulações é preparada com o próprio meio de cultura moído, argilas e, em alguns casos, agentes molhantes. Alguns produtos comercializados por centros de pesquisa e universidades são aplicados usando o seu meio líquido de produção ou o meio sólido lavado, para a retirada dos conídios. Mais recentemente, formulações oleosas com agentes emulsificantes um pouco mais elaboradas surgiram no mercado (ALVES et al., 2008b).

O uso de arroz cozido para a produção de *M. anisopliae* pelo método de bandeja, semelhante ao processo de produção em sacos de polipropileno, permitiu um rendimento médio de 6 a 11,4 kg do fungo.100 kg<sup>-1</sup> do produto, contendo 10<sup>10</sup> conídios.g<sup>-1</sup> do patógeno, enquanto que para *B. bassiana*, 3 kg do fungo.100 kg<sup>-1</sup> do produto, contendo 2x10<sup>11</sup> conídios.g<sup>-1</sup> (LEITE et al., 2003).

#### **4.4 Virulência da melhor formulação obtida**

Neste experimento foi avaliada a patogenicidade do tratamento que apresentou uma tendência de ser o melhor formulado obtido, ou seja, o tratamento T6, com 25% de volume de

água.volume de arroz<sup>-1</sup> (50mL), adição de caseína no meio e adição de 6 mL de suspensão de esporos do fungo *A. nomius*. Os resultados demonstram que a formulação obtida proporcionou um alto nível de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis* (Tabela 12), semelhante aos resultados obtidos quando foram aplicadas suspensões de esporos originadas diretamente das placas de crescimento do fungo, que corresponderam à concentração de  $1 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Porém, em função da semelhança dos resultados obtidos no ensaio anterior (item 4.5) ressalta-se que é possível que qualquer outro tratamento que tivesse sido testado resultasse em resultados semelhantes.

Tabela 12 - Mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* a partir da inoculação de 0,5 mL de e imersão das lagartas em suspensão de esporos de *Aspergillus nomius* e dos tratamentos testemunha (água destilada e esterilizada). (n= 50). Temp.: 25°C; U.R.: 60%; Fotofase: 12 h.

Tratamento	Lagartas mortas	
	Número total	Porcentagem
T1 - Inoculação de 0,5 mL/lagarta	47 a*	94
T2 - Imersão das lagartas em suspensão de esporos	45 a	90
T3 (Testemunha) - Inoculação de água destilada e esterilizada	6 b	12
T4 (Testemunha) - Imersão das lagartas em água destilada e esterilizada	5 b	10

\* Valores seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa através do Teste de Tukey (p<0,05).

Um bioensaio utilizado para quantificar respostas é um experimento no qual um organismo vivo é o alvo do teste. Quando um estímulo é aplicado, o organismos responde. Em patologia de insetos, dado um lote de insetos e diversas doses de um patógeno, o objetivo é identificar que dose seria suficiente para matar uma certa proporção de insetos. Assim, o organismo que está sendo testado é o inseto, o estímulo é a dose do patógeno e o resultado é a resposta quantitativa binária, representado pela morte ou sobrevivência dos organismos tratados (HADDAD, 1998).

A dose, concentração ou tempo que corresponde à probabilidade de resposta é a DL (dose letal ou efetiva), CL (concentração letal) ou TL (tempo letal). Assim, a  $CL_{50}$  é a concentração letal esperada que causa 50% de mortalidade nos organismos testados. O conhecimento da dose, concentração ou tempo letal é muito importante, pois conduz a conclusões a respeito da potência dos patógenos, da sensibilidade dos insetos à doença e até mesmo sobre previsões de controle de pragas através de inseticidas microbianos. Porém, é necessário ser cauteloso nas recomendações para campo, pois, normalmente, os bioensaios são conduzidos em laboratório, em dieta artificial e com temperatura, fotoperíodo e umidade relativa controlados, utilizando-se, geralmente populações de insetos pouco heterogêneas (HADDAD, 1998).

Com relação às diferentes dosagens utilizadas para definir a  $CL_{50}$  da formulação que obteve um melhor crescimento do fungo *A. nomius*, ou seja, concentração de  $2,88 \times 10^{10}$  (T6), percebe-se que, em diferentes dosagens, o fungo causou níveis crescentes de mortalidade às lagartas e que não há diferença significativa na mortalidade com dosagens a partir de  $0,4 \text{ mL.lagarta}^{-1}$  (Tabela 13).

Tabela 13 - Mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* utilizando-se diferentes dosagens de formulação de *Aspergillus nomius* com  $2,88 \times 10^{10}$  conídios. $\text{mL}^{-1}$ . (n= 50). Temp.: 25°C; U.R.: 60%; Fotofase: 12 h.

Concentração testada	Número total de lagartas mortas (mumificadas)
Testemunha	0 a*
0,1 mL.lagarta <sup>-1</sup> ou $2,88 \times 10^9$ conídios. $\text{mL}^{-1}$	29 b
0,2 mL.lagarta <sup>-1</sup> ou $5,76 \times 10^9$ conídios. $\text{mL}^{-1}$	32 b
0,4 mL.lagarta <sup>-1</sup> ou $1,15 \times 10^{10}$ conídios. $\text{mL}^{-1}$	43 c
0,8 mL.lagarta <sup>-1</sup> ou $2,30 \times 10^{10}$ conídios. $\text{mL}^{-1}$	48 c

\*Valores seguidos pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa através do Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A concentração letal para 50% dos indivíduos testado ( $CL_{50}$ ) e para 90% dos indivíduos testados ( $CL_{90}$ ) foram estimadas utilizando-se o método de Probit (Tabela 14).

Tabela 14 - Estimativa da  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  (em mL.lagarta<sup>-1</sup>) e intervalo de confiança do fungo *Aspergillus nomius* para lagartas de *Anticarsia gemmatalis*.

n *	$CL_{50}$ (IC) **	$CL_{90}$ (IC) **
250	$2,23 \times 10^7$ (0,0216 – 0,1365)	$1,46 \times 10^{10}$ (0,3459 – 0,8916)

\* n: número de insetos testados.

\*\* IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro.

Os resultados demonstram que concentrações na ordem de  $10^7$  por lagarta, seriam capazes de causar a morte de 50% dos indivíduos testados e que concentrações na ordem de  $10^{10}$ , causa a morte de 90% dos indivíduos testados. Com esses resultados, é possível concluir que as formulações obtidas com o cultivo do fungo em arroz pré-cozido com concentrações na ordem de  $10^{10}$  conídios.mL<sup>-1</sup>, são suficientes e adequadas para causar um bom nível de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis*, mesmo em pequenas concentrações aplicadas ( $2,23 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>.lagarta<sup>-1</sup>).

## 5 CONCLUSÕES

A partir das condições em que foi desenvolvida a presente pesquisa, conclui-se que:

- o fungo *Aspergillus nomius* foi patogênico e virulento em lagartas de *Anticarsia gemmatalis*;
- *A. nomius* é um fungo produtor de enzimas do tipo proteases, que podem atuar na penetração do fungo via cutícula do inseto;
- é possível obter elevadas concentrações de esporos de *A. nomius*, na casa de  $10^{10}$  conídios.mL<sup>-1</sup>, pelo método de produção do fungo em arroz pré-cozido, o que possibilita a formulação de produto industrial tendo esporos do fungo como ingrediente ativo e resultando em alto nível de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis*;
- *A. nomius* apresenta potencial com vistas a uma possível utilização como agente de controle biológico de *A. gemmatalis* em cultivos da soja; porém, por se tratar de um fungo que pode ser patogênico para o homem e para outros animais da fauna nativa, é necessário aprofundar estudos relacionados à produção de aflatoxinas por esse entomopatógeno e seus efeitos no ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, T. M. et al. Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**. v. 35, n. 1, p. 75- 82. 2006. Acesso em: 11 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v35n1/28397.pdf>>

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

ALVES, S. B. et al. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 637- 710, 1998.

ALVES S. B. et al. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, São Paulo: FEALQ. p. 69- 110, 2008a.

ALVES S. B. et al. O controle microbiano na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, São Paulo: FEALQ. p. 21- 48, 2008b.

BARROS, N. M.; ROSSATO, M.; ONOFRE, S. B. *Nomuraea rileyi* como agente de controle microbiano da lagarta-da-soja. In: MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna, São Paulo: EMBRAPA Meio Ambiente. p. 231- 249, 2000.

BITTENCOURT, V. R. E. P. Controle biológico de carrapatos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna/SP. EMBRAPA Meio Ambiente. Vol. 2. p. 145-172, 2000.

BRASIL, Companhia Nacional de Abastecimento- CONAB. **Boletim informativo: Acompanhamento da safra Brasileira de grãos, março de 2011/2012**. Londrina, Paraná. 35 p, 2012.

BRASIL, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Soja. **Sistemas de Produção: Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina, Paraná. ed: 15, 262 p, 2011.

BUENO, V. H. P. Controle biológico aumentativo com agentes entomófagos. In: VENZON, M.; JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa: UFV. p. 23-42, 2005.

CANTERI, M. G. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**. v. 1, n. 2, p 18-24, 2001.

CHOUVENC, T.; NAN-YAO, S.; GRACE, J. KENNETH. Fifty years of attempted biological control of termites – Analysis of a failure. *Biological Control*. n. 59. p. 69-82, 2011. Acesso em 30 de março de 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104996441100168X>

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, C. A.; LAZZAROTTO, J. J. O complexo agroindustrial da soja brasileira. **Circular Técnica- EMBRAPA Soja**. Londrina, Paraná. ed: 43, 12 p, 2008.

DE BORTOLI, S. A. et al. Aspectos nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, amendoim e dieta artificial. **Boletim de Sanidade Vegetal-Plagas**. v. 31. p. 171- 178. 2005. Acesso em: 11 de novembro de 2012. Disponível em: <[http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_plagas%2FBSVF-31-02\\_171-178.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%2FBSVF-31-02_171-178.pdf)>

DE BORTOLI, S. A. et al. Aspectos nutricionais e preferência da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de soja com e sem injúria. **Comunicata Scientiae**. v. 2, n. 3, p. 149-155. 2011. Acesso em: 20 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://comunicata.ufpi.br/index.php/comunicata/article/view/17/79>>

DEGRANDE, E. P.; VIVAN, M. L. Pragas da soja. **Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2008/2009**. n. 8. p. 73-108. 2008. Acesso em: 5 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAemC8AH/pragas-soja>>

EHRlich, C. K.; YU, J.; COTTY, J. P. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99. p. 518-527, 2005. Acesso em: 3 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02637.x/pdf>>

FERNANDES, O. A. Ecologia dos insetos. In: GUEDES, J. C.; DA COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria, UFSM. p. 51- 55, 2000.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. Micotoxinas. **Revista Fib**. ed. 2, n. 7, p. 32-40, 2009.

FRANCESCHINI, M. et al. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 23, p.32-37, 2001.

GAMA, C. de F. et al. Diversidade de fungos filamentosos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) e suas galerias em frutos de *Coffea canephora* (Pierre). **Neotropical Entomology**. v. 35, n. 5, p. 573-578. 2006. Acesso em: 11 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v35n5/02.pdf>>

GARCIA, C.; GONZÁLEZ, M. B.; BAUTISTA, N. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Revista Colombiana de Entomología**. v. 37, n. 2. p. 217-222, 2011. Acesso em: 11 de novembro de 2012. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v37n2/v37n2a08.pdf>

GLOER, J. B.; RINDERKNECHT, B. L. Nominine: A New Insecticidal Indole Diterpene from the Sclerotia of *Aspergillus nomius*. *Journal Organic Chemistry*. n. 54. p. 2530-2532, 1989. Acesso em 30 de março de 2013. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo00272a012>

HADDAD, M. L. Utilização de Polo-PC para análise de Probit. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 999-1012, 1998.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. **Circular Técnica- EMBRAPA Soja**. Londrina, Paraná. ed: 30, 67 p, 2000.

JÚNIOR, A. M. Controle de qualidade de produtos à base de organismos entomopatogênicos. In: BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas**. Lavras, Minas Gerais: UFLA. p. 381-409, 2009a.

JÚNIOR, A. M. Produção de agentes entomopatogênicos. In: BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas**. Lavras, Minas Gerais: UFLA. p. 277-310, 2009b.

JÚNIOR, M. A. Controle microbiano de pragas. In: VENZON, M.; JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa: UFV. p. 43-70, 2005.

LEITE, L. G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto, São Paulo. ESALQ/USP. 92 p, 2003.

LIMA, D. et al. A produção integrada de soja. **Circular Técnica- EMBRAPA Soja**. Londrina, Paraná. ed: 64, 8 p, 2008.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, B. P. E. M.; Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros – Uma Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia – FZVA**. v. 1, p. 235-257, 2007. Acesso em: 22 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2491>>

MENEZES, A. E. de L. **Controle biológico de pragas: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas**. Seropédica, Rio de Janeiro: EMBRAPA Agrobiologia. ed: 1ª, 44 p, 2003.

MOREIRA, H. J. da C.; ARAGÃO, F. D. **Manual de Pragas da Soja**. Campinas, São Paulo. ed: 1ª, 74 p, 2009.

MUÑOZ, R. et al. Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 1019-1026, 2010. Acesso em: 5 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v41n4/21.pdf>>

NUNES, F. R. A. et al. Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. **Revista Ciência Rural**. v. 9, p. 1853-1859. 2010. Acesso em: 3 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n9/a714cr2256.pdf>>

OLIVEIRA, M. A. de; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 3. p. 87-91, 2010. Acesso em: 20 de novembro de 2012. Disponível em: <[http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/2010/artigos\\_bjb\\_v70ne/15\\_bjft\\_v13ne\\_13e0011](http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/2010/artigos_bjb_v70ne/15_bjft_v13ne_13e0011)>

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 1015-1037, 1998.

PARRA, J. R. P. O Controle Biológico e o Manejo de Pragas: passado, presente e futuro. In: GUEDES, J. C.; DA COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria, UFSM, p. 59- 70, 2000.

PEREIRA, R. M; ALVES, S. B.; REIS, P. R. Segurança no emprego de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ. p. 171-191, 1998.

PEREIRA, G. M. M.; CARVALHO, P. E.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v. 1. p. 141-156. 2002. Acesso em 20 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/1143/944>>

PINTO, A. S. et al. **Controle Biológico de Pragas**. Piracicaba, São Paulo: Prol, ed: 1<sup>a</sup>., 287 p, 2006.

PIRES, M. L. et al. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua compatibilidade com alguns inseticidas usados na cultura do tomateiro. **Neotropical Entomology**. v. 39, n. 6, p. 977-983. 2010. Acesso em: 16 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v39n6/v39n6a20.pdf>>

RIBEIRO, R. M. M. et al. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Hindawi Publishing Corporation**. v. 20, p. 1-6. 2012. Acesso em: 30 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/psyche/2012/>>

ROBERTS, D. W.; KRASNOFF, S. B. Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 967- 980, 1998.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**, version 9.2. Cary, NC: SAS Institute, 2012.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, H. M.; *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Science Direct**. v. 56, p. 1268-1274. 2010. Acesso em: 30 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011000108X>>

SENNA-NUNES, M. et al. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em adultos de mosca doméstica (Diptera: Muscidae). **Parasitol Latinoam**. v. 57, p. 9-14, 2002. Acesso em: 10 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/pdf/parasitol/v57n1-2/art04.pdf>>

SILVA, M. L. R. B. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares em microrganismos. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília/DF, Recife/PE: Embrapa Informação Tecnológica, Instituto Agrônomo de Pernambuco. 1<sup>a</sup> ed. P 125-152, 2010.

SILVA, M. T. B. Manejo de insetos nas culturas de milho e soja. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. **Bases técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria/RS: UFSM/CCR/DFS, Pallotti, p. 169-200, 2000.

SOSA-GÓMEZ, R. D. et al. Manual de Identificação de Insetos e Outros Invertebrados da Cultura da Soja. **Documento - EMBRAPA Soja**. Londrina, Paraná. ed: 269, , 94 p, 2010.

SOSA-GÓMEZ, R. D. et al. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation systems. **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 4, p. 407-410. 2001. Acesso em: 16 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v30n3/a11v30n3.pdf>>

SPECHT, A. et al. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Isaria javanica* (Frieder. & Bally) Samson & Hywell-Jones (Fungi, Sordariomycetes) em lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 53, n. 3, p. 493-494. 2009. Acesso em 10 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbent/v53n3/29.pdf>>

TESSARI, C. N. E.; CARDOSO, P. S. L. A. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 18. 2012. Acesso em: 22 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria18/revisao/RV03.pdf>>

TIAGO, P. V.; FURLANETO, M. C. O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**. v.2, n.1, p.40-51, 2003. Acesso em: 22 de novembro de 2012. Disponível em: <[http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol2/4\\_artigo\\_v2.pdf](http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol2/4_artigo_v2.pdf)>

UCHIDA, H. et al. Purification and properties of an esterase from *Aspergillus nomius* HS-1 degrading ethylene glycol dibenzoate. **FEMS Microbiology Letters**. v. 223. p. 123-127. 2003. Acesso em: 13 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378109703003537>>

ZAPPELINI, L.O. et al. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. **Arquivo do Instituto de Biologia Biológico de São Paulo**. v. 1, p. 75-82. 2010. Acesso em: 12 de dezembro de 2012. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77\\_1/zappelini.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_1/zappelini.pdf)>