

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) APÓS APLICAÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) EM SOLUÇÃO OLEOSA.

Richard Henrique Siebra Bergamo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), João Alencar Pamphile (Co-orientador), Helio Conte (Orientador) e-mail: hconte@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia,
Genética e Biologia Celular.

Ciências Biológicas - Morfologia, Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: Controle biológico, histologia, Broca-da-Cana.

Resumo:

A *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Fabricius, 1794) é uma das principais pragas agrícolas brasileiras responsável por prejuízos à cultura da cana-de-açúcar, *Saccharum* spp. Nos últimos anos essa praga tornou-se um dos principais focos de estudos envolvendo controle biológico. Um biocontrolador amplamente utilizado atualmente é o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, tornando a presença de agrotóxicos dispensável. Visando testar sua eficácia, larvas de terceiro instar da *D. saccharalis* foram submetidas à aplicação de conídios do fungo *M. anisopliae* através do produto comercial METANAT CE (suspensão oleosa) e seu desenvolvimento foi acompanhado até completarem a metamorfose. Após as aplicações, observamos alterações morfológicas internas e externas na *D. saccharalis* porém, a eficácia da solução oleosa contendo conídios do *M. anisopliae* utilizada como bioinseticida ainda exige novos testes.

Introdução

D. saccharalis (Lepidoptera: Crambidae), popularmente conhecida como broca-da-cana, é uma das pragas agrícolas brasileiras responsável por inúmeros danos a cultura de cana-de-açúcar (VACARI *et al.*, 2012). As indústrias sucroalcooleiras vêm investindo cada vez mais em métodos de controle biológico para redução desta praga. Um dos principais métodos principais de manejo é através da utilização de organismos (predadores, parasitas ou patógenos) capazes de regular a população da praga em seus diferentes estágios de vida.

Os metabólitos produzidos, as proteínas, conídios e hifas dos fungos auxiliam na patogênese do inseto de diversas formas. O fungo se associa a cutícula do inseto, através de uma combinação de degradação enzimática e

pressão mecânica, gerando uma vantagem em relação a vírus e bactérias, pois estes tem preferência no inseto por via oral. A colonização pelo fungo se inicia no sistema tegumentar espalhando-se para os demais sistemas, tais como, circulatório, reprodutor, respiratório, digestivo, nervoso e imunológico, causando distúrbios físicos no inseto. (SCHNEIDER *et al.*, 2013).

Materiais e métodos

Nesta pesquisa utilizaram-se larvas da *D. saccharalis* fornecidas pelo Laboratório de Controle Biológico, Morfologia e Citogenética de Insetos localizado no Bloco H-67, Sala 7-A da UEM. A suspensão oleosa de fungos (METANAT-CE) é do fabricante Natural Rural, com registro no MAPA N. 007 DE 17/05/99. Esta solução foi solubilizada em água destilada, na proporção de 100mL para 0,5; 1,0 e 5,0mL de solução oleosa, foram obtidas as concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0%, respectivamente. Para cada concentração utilizamos três lotes (L1, L2 e L3) e um controle (C) separados em placas de Petri contendo cada uma 10 larvas da *D. saccharalis* em terceiro instar. Sob as larvas foi aplicado 0,7mL das diferentes concentrações utilizando-se a micropipeta Paguepet®, sendo no tratamento controle aplicado água destilada. Em seguida as larvas foram mantidas nas placas de Petri contendo dieta artificial (HENSLEY & HAMMOND, 1968), permaneceram acondicionadas em temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. As larvas identificadas mortas após 48 horas foram fixadas em Líquido de Bouin, armazenadas em álcool 70%, incluídas em parafina e processadas no micrótomo Leica com cortes de 6µm de espessura, corados com Hematoxilina/Eosina e impregnação de prata pelo método de Grocott. Na sequência foram observadas e documentadas fotograficamente através do microscópio Olympus CBA.

Resultados e Discussão

A atuação do fungo *M. anisopliae* nas larvas de *D. saccharalis* causou alterações na sua morfologia externa impedindo a completa transição de instar– ecdise – (Figura 1A e B). Observou-se os processos de extrusão e esporulação em algumas pupas, confirmados pela formação dos micélios laterais (Figura 1C e D). A cutícula nas larvas apresentaram coloração mais escura devido a uma intensa melanização, que segundo Hussein *et al.* (2012) manifesta-se como um ataque direto do fungo ao sistema imunológico do inseto (Figura 1B).

A coloração Gomori-Grocott cora o fundo de verde claro, os fungos de roxo escuro e a musculatura de verde escuro (Figura 1G). Através dessa coloração foi possível a visualização da estrutura reprodutiva do *M. anisopliae* (Figura 1E). Como descrito por Schneider *et al.*, 2013 os fungos iniciaram a penetração no inseto a partir da adesão com o material quitinoso, através da cutícula (Figura 1H). Foi possível observar esporos ao redor das fibras musculares e do corpo gorduroso (Figura 1F).

Com relação a mortalidade os dados obtidos encontram-se representados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Relação da mortalidade de *D. saccharalis* em diferentes concentrações das soluções contendo conídios do fungo *M. anisopliae*.

| Solução | Larvas em 3º instar (início do experimento) | Mortalidade (quantidade) | Mortalidade (%) |
|----------|---|--------------------------|-----------------|
| Controle | 30 | 03 | 10,0% |
| 0,5% | 30 | 04 | 13,3% |
| 5,0% | 30 | 05 | 16,6% |
| 1,0% | 30 | 15 | 50,0% |

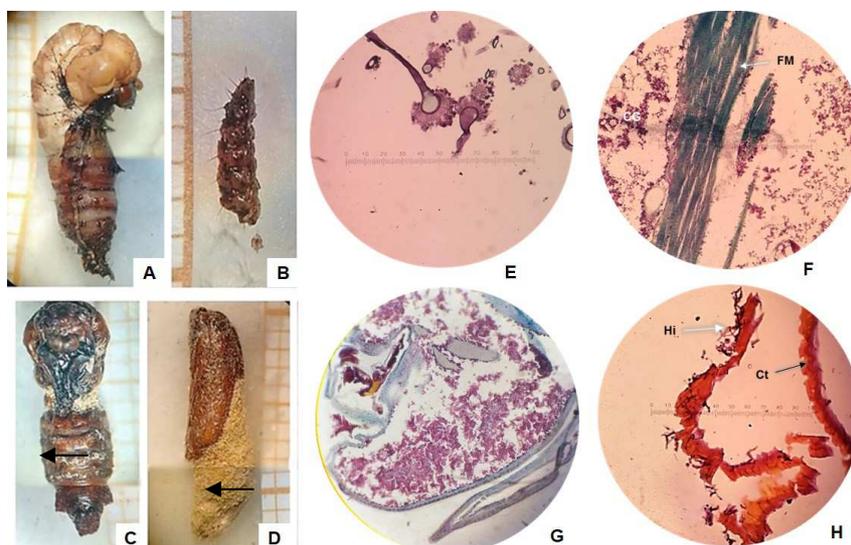


Figura 1 - *Diatraea saccharalis* que apresentaram alterações morfológicas internas e externas. (A) Ecdise Incompleta em larva na concentração de 0,5%. (B) Larva melanizada, concentração de 1,0%. (C) Pupa apresentando extrusão do fungo, concentração de 1,0%. (D) Pupa apresentando morfologia incompleta na concentração de 5,0%. (E) Larva na concentração 0,5% corada com Grocott, aumento de 20x (F) Larva na concentração 1,0% corada com Grocott, aumento de 40x (G) Larva da concentração de 1% corada com Grocott, aumento de 20x (H) Larva na concentração 0,5% corada com Grocott, aumento de 40x. →=Micélios laterais; CG=Corpo gorduroso; FM=Tecido muscular; Hi=Hifas; Ct=Cutícula.

Conclusões

O fungo *M. anisopliae* em larvas de terceiro instar da *D. saccharalis*, ocasionou visíveis alterações morfológicas internas e externas. No entanto, considerando o índice de mortalidade a eficácia da solução oleosa como bioinseticida ainda exige novos testes.

Agradecimentos

Agradecemos a Capes e CNPQ pela concessão da Bolsa PIBIC e pela oportunidade de desenvolver o presente projeto.

Referências

HENSLEY, S.D. & HAMMOND, A.H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **Journal of Econ. Entomol.**, Lanham, v.61, n.6, p.1742-1743, 1968.

HUSSEIN, K. A.; ABDEL-RAHMAN, M. A. A.; ABDEL-MALLEK, A. Y.; EL-MARAGHY, S.S.; JOO, J.H. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*. **Phytoparasitica**, v. 40: p.117–126, 2012.

SCHNEIDER, L. C. L.; SILVA, C. V. & CONTE, H., 2012. Infection, colonization and extrusion of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in pupae of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Entomol. Nematol.** v. 5, n. 1, p. 1-9, 2013.

VACARI, A. M.; GENOVEZ, G. de S.; LAURENTIS, V. L. de & BORTOLI, S. A. de. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade da *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 355-361, 2012.