



## Ocorrência e patogenicidade de *Beauveria bassiana* à *Hypsipyla grandella* coletada em Brasília

Marcelo Tavares de CASTRO<sup>1</sup>\*, Sandro Coelho Linhares MONTALVÃO<sup>2</sup>,  
Daniela Aguiar de SOUZA<sup>3</sup>, Rose Gomes MONNERAT<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

<sup>3</sup> Prédio de Controle Biológico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil

\* E-mail: marceloengflorestal@gmail.com

Recebido em outubro/2016; Aceito em fevereiro/2017.

**RESUMO:** Um dos principais entraves para o estabelecimento do plantio de mogno (*Swietenia macrophylla* King) é a ocorrência da *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), que ataca o broto terminal em mudas e árvores novas, formando galerias em seu interior. O trabalho teve como objetivo isolar, identificar e verificar a capacidade patogênica de fungos associados à *H. grandella* em Brasília, Brasil. Para isso, 200 frutos de mogno atacados pelo inseto foram coletados e analisados. Uma lagarta com sintoma de infecção fúngica foi encontrada. A lagarta sintomática foi colocada em câmara úmida para formação de esporos e então, colônias puras foram obtidas a partir de diluições seriadas e repicagens sucessivas do fungo. Foi feita a sua caracterização molecular e morfológica. O isolado foi identificado como *Beauveria bassiana*, um entomopatógeno muito utilizado em programas de controle biológico. As colônias puras eram de cor branca e, ao microscópio óptico, apresentavam conídios unicelulares, células conidiogênicas holoblásticas com denticulos conspícuos, caracterizando a espécie. Quanto ao teste de patogenicidade, o isolado se mostrou eficaz, com mortalidade de 70% de ovos e lagartas recém-eclodidas. Este é o primeiro relato de um fungo entomopatogênico encontrado em *H. grandella* no Distrito Federal. O isolado foi incorporado na Coleção de Fungos de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**Palavras-chave:** entomologia florestal, controle biológico, fungo entomopatogênico.

### Occurrence and pathogenicity of an isolate of *Beauveria bassiana* at *Hypsipyla grandella* collected in Brasilia, Brazil

**ABSTRACT:** One of the main obstacles to the establishment of mahogany plantations is the occurrence of *Hypsipyla grandella*, which attacks the terminal bud in new seedlings and trees, forming galleries. This study aimed to isolate, identify and verify the pathogenic ability of fungi associated with *H. grandella* in Brasilia, Brazil. For this, 200 fruit attacked by insects were collected and analyzed. A caterpillar with fungal infection symptom was found. Symptomatic caterpillar was placed in a humid chamber for increased formation of spores and then pure colonies were obtained from serial dilutions and successive subcultures of the fungus. Its molecular, morphological and pathogenic was made. The isolate was identified as *Beauveria bassiana*, an entomopathogen widely used in biological control programs. Pure colonies were white, and the optical microscope showed unicellular conidia, conidiogenous cells with denticles conspicuous, featuring the species. As for the pathogenicity test, the isolated was effective, with 70% mortality of eggs and newly hatched larvae. This is the first report of an entomopathogenic fungus found in *H. grandella* the Federal District, Brazil. The isolate was incorporated into the "Coleção de Fungos de Invertebrados" of "Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia".

**Keywords:** forest entomology, biological control, entomopathogenic fungus.

## 1. INTRODUÇÃO

O mogno (*Swietenia macrophylla* King) é uma espécie florestal de origem amazônica que possui madeira de elevada qualidade e com alto valor comercial (Lorenzi, 1992; Carvalho, 2007), por isso é extremamente apreciada e considerada como nobre ou "madeira de lei" em vários países. O plantio de mogno

para florestamento e reflorestamento seria uma alternativa viável tanto para a recuperação de áreas degradadas, como para o estabelecimento comercial sustentável de madeira. Porém, um dos principais entraves é a ocorrência da praga *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), que ataca o broto terminal em mudas e árvores novas, formando galerias em seu interior (Grijpma, 1976; Ohashi et al., 2000). O crescimento,

estabelecimento e formação de um fuste reto e com o menor número de nós possível é comprometido devido ao ataque do inseto, resultando em árvores com bifurcação do fuste, com perdas de até 35% em altura nos três primeiros anos e, após ataques sucessivos, pode ocasionar a morte da planta (Ohashi et al., 2002). Tentativas do cultivo de mogno fora de sua área de origem foram consideradas um fracasso devido ao ataque de *H. grandella* e, em muitos casos, as mudas serem de baixa qualidade (Carvalho, 2007).

Não existe atualmente uma técnica eficaz para o controle da broca-do-mogno. As medidas usualmente utilizadas em diferentes países e com diferentes graus de sucesso envolvem o manejo silvicultural, com o plantio consorciado de mogno e outras espécies resistentes à *H. grandella*, controle químico e o controle biológico com o uso de inimigos naturais (Lunz et al., 2009).

O uso de fungos entomopatogênicos pode ser uma ferramenta eficaz no controle de insetos, pois possuem grande versatilidade, contaminam os insetos por diferentes vias (penetrando através do tegumento, por via oral, anal, entre outras formas) e em diferentes estágios de desenvolvimento (Costa et al., 2008). Os fungos mais utilizados comercialmente para o controle de insetos-praga de florestas são *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Costa et al., 2008). Segundo Alves (1998), os sinais das doenças produzidas por *B. bassiana* em insetos são caracterizados inicialmente pela interrupção da alimentação e desorientação, posteriormente aparecem as hifas através dos espiráculos e, finalmente, pela presença do micélio que envolve externamente o cadáver do inseto, dando o aspecto de algodão, de cor branca.

Devido a sua elevada importância comercial, ecológica e paisagística, o interesse em realizar pesquisas com o objetivo de preservar, conservar e garantir o uso sustentável do mogno é evidente, sendo necessárias pesquisas com o intuito de diminuir os prejuízos causados por essa praga. Portanto, o trabalho teve como objetivo isolar, identificar e verificar a capacidade patogênica de um fungo encontrado em *H. grandella* em Brasília, Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção de lagartas com sintomas

Foram analisados 200 frutos de *Swietenia macrophylla* coletados em Brasília, Distrito Federal (coordenadas: 15°74'28"S e 47°89'43"W GRW), para a verificação da ocorrência, quantificação e isolamento de possíveis agentes fúngicos de biocontrole da *H. grandella*. Os frutos foram abertos com o auxílio de um canivete e os insetos que apresentaram sintomas e sinais de fungos foram separados e individualizados em recipientes plásticos estéreis e armazenados em geladeira até o seu isolamento.

### 2.2 Isolamento do fungo entomopatogênico

Os insetos sintomáticos foram colocados em câmara úmida para maior formação de esporos e então, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e uma agulha, parte do fungo foi transferido para meio BDA. Colônias puras foram obtidas a partir de diluições seriadas e repicagens sucessivas do fungo.

### 2.3 Caracterização morfológica

As estruturas fúngicas foram retiradas do meio de cultura usando-se um estilete de ponta fina e em seguida colocadas

sobre lâminas de vidro com corantes à base de lacto-glicerol / azul de algodão (*Cotton blue*) ou glicerol-KOH / floxina básica, as quais foram seladas com duas camadas de esmalte de unha comercial. Foram descritos e medidos os conidióforos, células conidiogênicas e os conídios do fungo por meio de microscópio óptico.

Para a visualização das estruturas fúngicas em microscopia eletrônica de varredura, amostras do fungo foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M pH 7,0 e colocados em rotator orbital (4 rpm) por 24 horas. Após esta etapa, as amostras foram submetidas a duas lavagens de 15 minutos em tampão cacodilato de sódio a 0,1M pH 7,2, seguidas de imersão em solução de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 2% por 2 horas. As amostras pós-fixadas em OsO<sub>4</sub> foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 3 vezes seguidas e por mais 2 vezes com água a cada 15 minutos. Foi realizada a desidratação dos materiais em série etanólica crescente (10, duas vezes de 30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo por 2 horas em cada uma das concentrações, sempre utilizando um rotator orbital. Em seguida, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico do CO<sub>2</sub> em aparelho Baltec CPD 030, recobertas com 25 nm de ouro em aparelho MED 010 da Balzers e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

### 2.4 Caracterização molecular e sequenciamento

O isolado purificado cresceu em meio de cultura BDA, em câmara de germinação (BOD) à 25 ± 0.5°C por 10 dias. Foram cortados três discos do meio de cultura contendo o fungo e inoculados em frasco de Erlenmeyer com 200 mL de meio líquido SDY (4% dextrose, 1% extrato de levedura e 1% peptona). Após 72h de incubação em shaker rotativo a 25 ± 0.5°C e 250rpm, o micélio foi coletado em papel de filtro sob filtração a vácuo e utilizado para a extração de DNA segundo o método descrito por Raeder e Broda (1985). A região intergênica Bloc foi amplificada e sequenciada de acordo com Renner et al. (2011). A sequência obtida foi editada pelo programa DNA Baser (DNABaser Sequence Assembler 3, Heracle Biosoft, Pitesti, Romania) e alinhada com outras 23 sequências obtidas pelo banco de dados GenBank, segundo Renner et al. (2011), através do programa MEGA 5.03 (Tamura et al. 2011), utilizando o clustaw. Este alinhamento foi utilizado para a construção de uma árvore filogenética (Figura 2), através do programa Mr Bayes, utilizando as informações geradas pelo critério de Akaike (AIC) através do JModeltest 1.1 e com 1 milhão de gerações.

### 2.5 Bioensaio de mortalidade

O isolado obtido foi testado quanto a sua patogenicidade em *H. grandella* no Laboratório de Micologia de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, Brasil, em maio de 2015. Para a realização do ensaio, foram utilizados ovos férteis, obtidos a partir da criação do inseto feita com dieta natural a base de sementes de mogno. Com o propósito de verificar se o isolado obtido apresenta algum efeito deletério no inseto, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com apenas um tratamento e cinco repetições, com 10 ovos por repetição. O tratamento consistiu na inoculação dos ovos na suspensão de conídios com água destilada autoclavada com 0,05% de Tween 80. A concentração utilizada foi de 1 x 10<sup>8</sup> conídios/mL além da testemunha com água destilada e Tween 80. Os ovos e lagartas foram observados

diariamente durante sete dias, quanto ao parasitismo pelo fungo e mortalidade de lagartas recém-eclodidas. Foram colocadas duas folhas novas de mogno esterilizadas para a alimentação das lagartas neonatas. Esse bioensaio foi repetido duas vezes para comprovar a ação patogênica do fungo.

As lagartas neonatas mortas foram retiradas dos recipientes, desinfetadas externamente com álcool 70% e mantidas em câmara úmida para esporulação e confirmação do agente causal da mortalidade.

### 3. RESULTADOS

Apenas cinco lagartas foram encontradas mortas no interior dos frutos, representando 2,78% do total de lagartas encontradas ( $n = 180$ ). Destas, três apresentaram sintomas de bacteriose, uma de fungo (Figura 1 - A) e outra por causas desconhecidas.

O fungo isolado da lagarta em meio BDA foi identificado como *Beauveria bassiana*, com colônias brancas a ligeiramente amareladas de aspecto cotonoso e pulverulento, características do gênero *Beauveria* (De Hoog, 1972; McCoy et al., 1988) (Figura 1 - B e C). A análise das estruturas fúngicas em microscopia óptica e em microscopia eletrônica de varredura mostrou conídios de forma globosa a subglobosa, asseptados, lisos, numerosos, com germinação uni ou bipolar (Figura 1 - D, E e F). Os conidióforos formam cachos densos, com células conidiogênicas em zigue-zague. O isolado foi depositado na Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CG 1301/BRM 029000).

A análise filogenética do isolado (CG1301) o identificou como *Beauveria bassiana* com grande suporte através da inferência bayesiana (Figura 2), agrupando-o com os outros dois isolados de referência de *B. bassiana*.

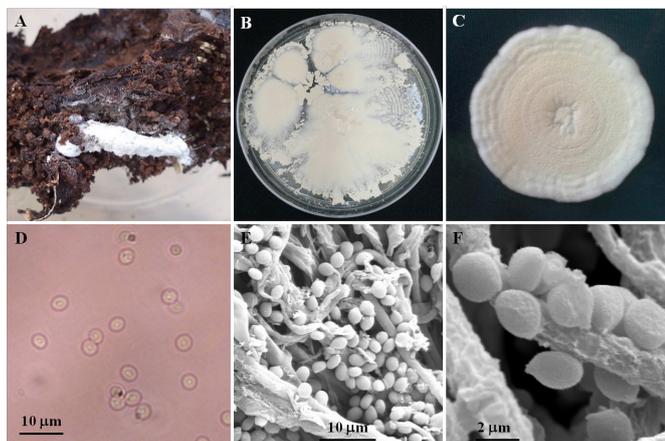


Figura 1. *Beauveria bassiana* isolado de *Hypsipyla grandella*. A - Lagarta com sintomas de infecção fúngica. B - Cultura de *B. bassiana* em meio BDA. C - Detalhe da cultura monospórica em meio BDA, após dez dias de crescimento. D - Conídios de *B. bassiana* vistos em microscópio óptico. E e F - Detalhe dos conídios do fungo vistos em microscopia eletrônica de varredura.

Figure 1. *Beauveria bassiana* isolated from *Hypsipyla grandella*. A - Caterpillar with symptoms of fungal infection. B - *B. bassiana* culture in PDA medium. C - Detail of the monospore culture in PDA medium, after ten days of growth. D - Conidia of *B. bassiana* seen under optical microscope. E and F - Detail of the conidia of the fungus seen in scanning optical microscopy.

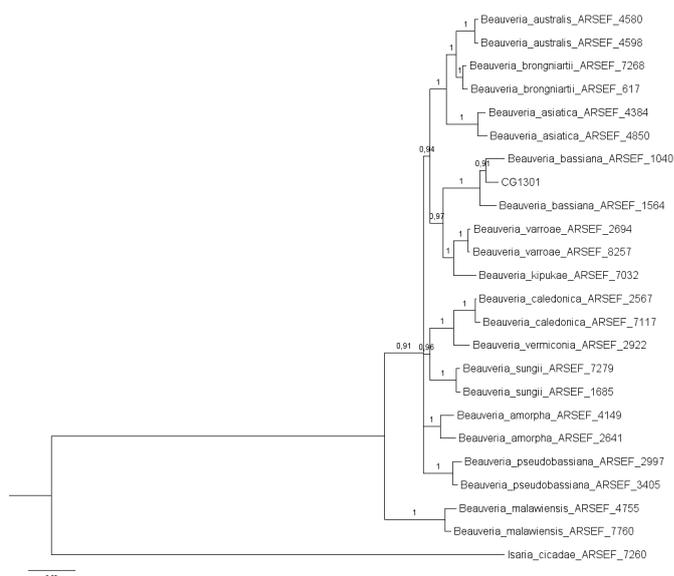


Figura 2. Árvore filogenética dos isolados do gênero *Beauveria* através da análise Bayesiana da região intergênica Bloc. Os valores de suporte da inferência bayesiana são mostrados na árvore.

Figure 2. Phylogenetic tree of the genus *Beauveria* isolates through the Bayesian analysis of the Bloc intergenic region. Bayesian inference support values are shown in the tree.

Após aproximadamente sete dias da inoculação do fungo nos ovos, todos os ovos da testemunha se mostraram viáveis, ao passo que cinco ovos (10%) com o tratamento com *B. bassiana* foram parasitados. Porém, 30 (trinta) lagartas recém-eclodidas do tratamento com o fungo morreram após sete dias (70%), o que indica que o isolado obtido pode ser promissor para ser utilizado futuramente em programas de controle da *H. grandella*.

### 4. DISCUSSÃO

A quantidade de lagartas mortas encontradas foi inferior à verificada por Thomazini et al. (2011) quando coletaram lagartas no broto terminal de árvores de mogno, chegando a nove em um total de 28 coletadas no mês de maio de 2010 em Garça/SP. A mortalidade larval natural foi de 14,8% em todo o estudo. Já em um trabalho realizado por Taveras et al. (2004), na Costa Rica, a taxa de mortalidade foi de 24%. A baixa taxa de mortalidade dos insetos no presente estudo pode ser atribuída ao fato do inseto estar protegido de possíveis predadores e de contaminação por fungo e bactérias, por ser de hábito críptico (Hauxwell et al., 2001) e ficar a maior parte do tempo escondido no interior dos frutos de mogno. Além disso, o fato de o estudo ser realizado em árvores urbanas também pode influenciar a mortalidade, visto que na cidade há menor número de inimigos naturais quando comparada ao ambiente natural (Ruszczuk, 1986).

Yamazaki et al. (1990) reportaram um isolado de *Beauveria* não identificado infectando *H. grandella* no Peru, com baixa mortalidade. Misra (1993) isolou *B. bassiana* em cadáveres de *H. robusta* na Índia e constatou 80% de mortalidade de lagartas quando inoculadas com esporos obtidos da cultura pura do fungo em água. Berrios e Hidalgo-Salvatierra (1973) testaram a patogenicidade de esporos de *B. bassiana* em *H. grandella*. As lagartas foram imersas em uma suspensão de esporos e apresentaram mortalidade de 13,9% sob uma concentração de  $1,4 \times 10^6$  esporos/mL. Segundo os autores, a maioria das lagartas morreram oito dias após a inoculação do fungo. Estudos sobre

agentes naturais de biocontrole da *H. grandella* no Brasil são praticamente inexistentes.

## 5. CONCLUSÕES

A partir da análise de frutos de mogno de árvores situadas na cidade de Brasília, Distrito Federal, foi encontrado um fungo entomopatogênico identificado como *Beauveria bassiana* associado à *Hypsipyla grandella*. Sua patogenicidade foi testada e comprovada, com mortalidade de aproximadamente 70% de lagartas recém-ecloídas.

Com esse resultado, o isolado obtido parece ser uma alternativa promissora e viável ao uso de produtos químicos. Porém, novos ensaios devem ser conduzidos em diferentes concentrações de esporos do fungo para definir a dosagem mais eficiente.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p.289-382, 1998.
- BERRIOS, F.; HIDALGO-SALVATIERRA, O. Susceptibility of the larva to the fungi *Beauveria bassiana* (Bal.) and *B. tenella* (Del.). In: Grijpma, P. (ed.) **Studies on the shoot borer *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep. Pyralidae**, v.1, p.68-70, 1973.
- CARVALHO, P. E. R. **Mogno - *Swietenia macrophylla***. Colombo-PR: Embrapa Florestas, 2007. 12 p. (Circular Técnica, 140).
- COSTA, E. C.; D'AVILA, M.; CANTARELLI, E. B. **Entomologia Florestal**. Santa Maria: Editora UFSM, 2008. 239p.
- DE HOOG, G. S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, v. 1, p. 1-41, 1972.
- GRIJPMMA, P.; GARA, R. I. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller): II. Host preference of the larva. **Turrialba**, v. 20, p. 241-247, 1976.
- HAUXWELL, C.; VARGAS, C.; OPUNI FRIMPOG, E. Entomopathogens for control of *Hypsipyla* spp. Pgs 131-139. In: FLOYD, R. B.; HAUXWELL, C. (Eds.) **Proceedings of International Workshop on *Hypsipyla* Shoot Borers in Meliaceae**. Kandy, Sri Lanka. 20-23 August, 1996. ACIAR, Canberra, 2001.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas no Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 1992. 352p.
- LUNZ, A. M.; THOMAZINI, M. J.; MORAES, M. C. B.; NEVES, E. J. M.; BATISTA, T. F. C.; DEGENHARDT, J.; SOUSA, L. A.; OHASHI, O. S. *Hypsipyla grandella* em Mogno (*Swietenia macrophylla*): situação atual e perspectivas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 59, p. 45-55, 2009. <http://dx.doi.org/10.4336/2009.pfb.59.45>
- MCCOY, C. W.; SAMSON, R. A.; BOUCIAS, D. G. Entomogenous fungi. In: IGNOFFO, C. M. (ed.) **Handbook of Natural Pesticides**. v. V. CRC Press, p.151-237, 1988.
- MISRA, R. M. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, a fungal pathogen of *Hypsipyla robusta* Moore (Lepidoptera: Pyralidae). **Indian Journal of Forestry**, v. 16, p. 236-238, 1993.
- OHASHI, O. S.; COSTA, M. S. S.; SILVA, J. N. M.; SILVA, M. F. G. G. **Resistência do tipo antibiose apresentada pelas folhas novas de *Toona ciliata* M. J. Roem às lagartas de *Hypsipyla grandella* Zeller**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 3p. (Comunicado Técnico, 48)
- OHASHI, S. T.; SILVA, J. N. M.; SILVA, M. E. C. E.; COSTA, M. S. S.; SARMENTO JUNIOR, R. G.; SANTOS, E. B.; ALVES, M. Z. N.; PESSOA, A. M. C.; SILVA, T. C. O.; BITTENCOURT, P. R. G.; BARBOSA, T. C.; SANTOS, T. M. Manejo Integrado da Broca do Mogno *Hypsipyla grandella* Zeller (Lep. Pyralidae). In: POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R. **Manejo integrado das principais pragas e doenças de cultivos amazônicos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 304p.
- READER, U. E.; BRODA, P. RAPD preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Cambridge, v. 1, p. 17-20, 1985. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- RENNER, M.; DOMANOV, Y.; SANDRIN, F.; IZEDDIN, I.; BASSEREAU, P.; TRILLER, A. Lateral diffusion on tubular membranes: quantification of measurements bias. **PLoS ONE**, v. 6, 2011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025731>
- RUSZCZYK, A. Hábitos alimentares de borboletas adultas e sua adaptabilidade ao ambiente urbano. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 46, n. 2, p. 419-427, 1986.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- TAVERAS, R.; HILJE, L.; CARBALLO, M. Development of *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) in response to constant temperatures. **Neotropical Entomology**, n. 33, p. 1-6, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000100002>
- THOMAZINI, M. J.; TEDESCHI, V. H. P.; MEIRA, J. R. de. Incidência e danos da broca-das-meliáceas, *Hypsipyla grandella*, em mogno, no interior paulista. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 6p. (Comunicado Técnico, 280)
- YAMAZAKI, S.; TAKETANI, A.; FUJITA, K.; VASQUES, C.; IKEDA, T. Ecology of *Hypsipyla grandella* and its seasonal changes in population density in Peruvian Amazon forest. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 24, p. 149-155, 1990.