

BIOLOGICAL CONTROL

Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o Percevejo Predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae)

ÍTALO W.B. FRANÇA, EDMILSON J. MARQUES¹, JORGE B. TORRES E JOSÉ V. OLIVEIRA

Depto. Agronomia/Área de Fitossanidade/UFRPE, Av. D. Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, emar@ufrpe.br; ¹Autor correspondente

Neotropical Entomology 35(3):349-356 (2006)

Effects of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the Predatory Stinkbug *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae)

ABSTRACT - Entomopathogenic fungi and the predatory stinkbug *Podisus nigrispinus* (Dallas) can target simultaneously the same or different pests in agroecosystems. Topical contact during fungal dispersion or spraying, walking on plant surfaces and ingestion of contaminated prey are some of possible ways of interactions between fungi and the predatory stinkbug. The impact of three isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (866, 1022 and 1189) and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (604, 634 and 561) against nymphs and adults of *P. nigrispinus* was investigated under laboratory conditions. *M. anisopliae* caused higher mortality compared to *B. bassiana* either by topical application or by dry residue on cotton leaves. Topic contact with both fungi caused higher mortality to the predator. No mortality confirmation was reported for the adults. Nymphs fed with cotton leafworm larvae *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) contaminated by the fungi had their reproduction affected, but this was not observed when adult predators fed on contaminated larvae. These findings suggest that isolates of *M. anisopliae* can cause mortality of *P. nigrispinus* nymphs by topical contact, while isolates of *B. bassiana* were less harmful by all ways of infection as compared to *M. anisopliae*.

KEY WORDS: Asopinae, entomopathogenic fungus, non-target effect, biological control

RESUMO - Fungos entomopatogênicos e o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) podem ocorrer simultaneamente nos agroecossistemas infectando o mesmo inseto alvo ou alvos diferentes. O contato durante a disseminação do fungo ou pulverização, caminhamento em superfícies vegetais tratadas e predação de indivíduos contaminados estão entre as possíveis vias de interação entre fungos entomopatogênicos e percevejos predadores. Este trabalho avaliou o impacto de três isolados de cada um dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (866, 1022 e 1189) e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (604, 634 e 561) sobre ninfas e adultos de *P. nigrispinus* pelas vias de contato, residual seco e ingestão de presas contaminadas, em laboratório. *M. anisopliae* ocasionou maior mortalidade do predador que *B. bassiana*, tanto por contato como por resíduo seco do fungo. Entre as vias de infecção dos fungos o contato causou maior mortalidade do predador. Não houve confirmação de mortalidade de adultos em nenhuma das vias de infecção pelos isolados testados. A predação de larvas de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) contaminadas com os fungos afetou a produção de ovos das fêmeas adultas, porém o mesmo não foi constatado quando adultos alimentaram-se de presas contaminadas. Os resultados sugerem que isolados de *M. anisopliae* podem causar mortalidade de ninfas de *P. nigrispinus* por contato, enquanto os isolados de *B. bassiana* foram de menor impacto em todas as vias de infecção estudadas, comparados aos isolados de *M. anisopliae*.

PALAVRAS - CHAVE: Asopinae, fungo entomopatogênico, seletividade, controle biológico

Agentes de controle biológico podem ocorrer simultaneamente nos agroecossistemas atacando diferentes ou o mesmo inseto alvo. Os fungos dependem do vento, chuva e outros fatores para sua disseminação. Por outro lado, os insetos predadores exploram relativamente grandes áreas foliares em busca de suas presas e podem entrar em contato com conídios dos fungos depositados sobre as folhas, serem atingidos diretamente com o entomopatógeno no momento da aplicação ou no ato da disseminação do fungo pelo vento ou, ainda, pela ingestão de presas infectadas.

O uso de fungos no manejo de pragas tem sido preconizado, embora as interações desses com insetos entomófagos tenham sido pouco estudadas. Considerações foram feitas sobre os possíveis efeitos negativos da associação de mais de um agente de controle biológico, incluindo fungos entomopatogênicos (van Driesche & Bellows 1996).

O ecossistema algodoeiro apresenta um rico complexo de inimigos naturais associados, entre eles percevejos predadores como *Podisus nigrispinus* (Dallas) e os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Gravena & Cunha 1991, Harper & Carner 1996, Gravena 2000). Tanto *P. nigrispinus* como *M. anisopliae* e *B. bassiana* destacam-se pelo amplo espectro de presas e hospedeiros utilizados, incluindo pragas do algodoeiro e de outras culturas de importância econômica (Ramalho 1994, Harper & Carner 1996). Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* têm sido utilizados como agentes de controle biológico aplicado em diferentes culturas (Alves 1998). Da mesma forma, *P. nigrispinus* tem sido observado naturalmente em diferentes agroecossistemas e vem sendo estudado e produzido para liberações objetivando o controle de pragas (Zanuncio et al. 2002).

O estudo da interação desses agentes de controle biológico é importante, pois ela poderá ocorrer diretamente durante as aplicações, em contato com plantas tratadas ou quando predadores alimentam-se de insetos já infectados pelos fungos. Diferentemente das bactérias e dos vírus entomopatogênicos, que requerem ingestão para causar infecção, os fungos podem infectar os insetos via oral, penetrar pelos espiráculos e, particularmente, através da superfície do tegumento (Alves 1986). Os insetos entram em contato direto com os conídios dos fungos no momento da aplicação ou pelos resíduos destes depositados sobre as folhas, justificando desta maneira os testes para avaliar todas as vias possíveis de infecção.

Os fungos são responsáveis por cerca de 80% das enfermidades que ocorrem naturalmente nos insetos em agroecossistemas (Batista Filho 1989, Alves 1998, Robbs & Bitten 1998). No Brasil, a exemplo de outros países, os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* vêm sendo os mais estudados em função de seu amplo espectro de ação e facilidade de produção em laboratório (Alves 1992), tendo sido produzidos e utilizados como agentes de controle de pragas agrícolas, pertencentes a várias ordens (Alves 1998). O emprego de entomopatógenos de maneira integrada com insetos predadores pode ser uma alternativa viável, pois a compatibilidade de fungos entomopatogênicos com parasitóides e predadores foi demonstrada (Goettel et al. 1990). No entanto, casos de incompatibilidade também são

relatados (Cook et al. 1996), incluindo o percevejo predador *Perillus bioculatus* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) (Todorova et al. 2002) e joaninhas (Magalhães et al. 1988, James & Lighthart 1994).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de isolados dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em laboratório através do tratamento tópico, caminhamento sobre folhas tratadas e predação de presas infectadas para ninfas de 5ª instar e adultos do percevejo predador *P. nigrispinus*.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Patologia e Controle Biológico de Insetos da Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife, PE.

Criação de presa alternativa. A presa alternativa *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) foi criada em bandejas plásticas com dieta à base de farelo de trigo (95%) levedura de cerveja (5%) sendo oferecidas batata-doce e cenoura periodicamente aos adultos e larvas como suplemento alimentar e de umidade.

Curuquerê-do-algodoeiro. A criação de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) foi estabelecida a partir de pupas obtidas do setor de Entomologia da Embrapa-Algodão. Após a emergência, os adultos foram transferidos para gaiolas de tubo PVC, medindo 20 cm de altura por 19,5 cm de diâmetro. A parede interna da gaiola foi revestida com papel sulfite para obtenção de posturas, sendo mantidos cinco casais por gaiola. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 30%, sendo as lagartas alimentadas com folhas de algodoeiro da cultivar CNPA Precoce 1.

Criação do percevejo predador. A criação de *P. nigrispinus* foi iniciada com posturas fornecidas pelo Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, SP. A criação foi estabelecida de acordo com a metodologia proposta por Torres et al. (1996), que consiste no confinamento de casais de *P. nigrispinus* em potes plásticos de 500 ml de capacidade, com papel absorvente no seu interior como substrato para oviposição. Como presas, foram utilizadas larvas de *T. molitor* com 25-30 mm de comprimento. Ninfas de primeiro instar receberam apenas água em um chumaço de algodão colocado centralmente no interior da placa de Petri. A partir do segundo instar até a emergência dos adultos, dez ninfas foram mantidas em potes plásticos (500 ml) contendo papel absorvente amassado no seu interior. A presa *T. molitor* e umidade foram repostas sempre que necessário nas placas de criação.

Obtenção e produção dos isolados dos fungos. Foram utilizados os isolados 1189, 866 e 1022 de *M. anisopliae* e 604, 634 e 561 de *B. bassiana* obtidos de diferentes hospedeiros e localidades, e pertencentes à micoteca do Laboratório de Patologia de Insetos da Área de Fitossanidade

da UFRPE (Tabela 1). A seleção dos isolados foi baseada em estudos de laboratório com lagartas de *A. argillacea* (César-Filho *et al.* 2002). Os isolados foram repicados e multiplicados em Batata-Dextrose-Agar mais antibiótico (BDA+A) ou meio completo (MC), constituído de extrato de levedura, glucose, sais minerais, ágar, e água destilada, conforme Alves *et al.* (1998). As suspensões foram aferidas mediante quantificação em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico, sendo posteriormente ajustadas para 10^7 conídios ml^{-1} .

Viabilidade e patogenicidade dos fungos. A viabilidade dos isolados foi avaliada utilizando-se duas placas de Petri contendo BDA+A. Nas placas, foi colocado 0,1ml da suspensão correspondente a 10^7 conídios ml^{-1} , espalhando-se com alça de drigasly. As placas foram incubadas em câmara climatizada tipo BOD a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase por 24h. As leituras foram efetuadas em microscópio óptico mediante a determinação do percentual de conídios germinados e não germinados, contando-se 100 conídios por placa 24h após o plaqueamento, totalizando 200 conídios em cada avaliação.

Para comprovação da patogenicidade e virulência dos isolados testados nesta pesquisa, realizou-se bioensaio pulverizando-se uma suspensão com 10^7 conídios ml^{-1} , em 30 lagartas de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) de 3º instar para cada isolado, por se tratar de inseto altamente susceptível ao entomopatogênico, bem como devido a sua facilidade de criação em laboratório.

Tratamento tóxico do predador. Ninfas de 5º instar e adultos (machos e fêmeas) com até 48h de idade de *P. nigrispinus* foram tratados topicamente com a deposição de 0,5 μl das suspensões dos fungos na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} . A aplicação foi feita no tórax dos insetos com o auxílio de um micropipetador BenchMatch®. Posteriormente, os insetos foram transferidos para potes plásticos de 500 ml forrados com papel de filtro. Presas e umidade foram oferecidas sempre que necessário. Em seguida, os potes plásticos foram acondicionados em câmara climatizada tipo BOD a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase.

O experimento foi efetuado em delineamento

Tabela 1. Isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e seus hospedeiros.

Fungo/isolados	Hospedeiro
<i>M. anisopliae</i>	
1022	<i>Phyllophaga</i> sp.
866	<i>Atta</i> spp.
1189	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	
604	Amostra de solo
634	<i>Solenopsis invicta</i>
561	<i>Solenopsis</i> sp.

inteiramente casualizado, com sete tratamentos (seis isolados e testemunha) e cinco repetições. Cada repetição foi composta de cinco insetos, totalizando 25 ninfas ou 25 adultos por tratamento. A testemunha foi tratada com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80® a 0,01%. As avaliações foram feitas diariamente, por 10 dias para verificação da duração do 5º instar e/ou mortalidade de ninfas e adultos de *P. nigrispinus*. Os insetos mortos foram transferidos para câmara úmida e mantidos à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e fotofase de 12h para confirmação do agente causal.

Tratamento por meio de caminhamento em folhas tratadas. Folhas de algodoeiro da cultivar CNPA Precoce 1 completamente expandidas, foram coletadas, lavadas com água corrente e hipoclorito de sódio a 0,5% e, posteriormente, em água destilada. Após as folhas perderem o excesso de umidade da lavagem, foram pulverizadas com os isolados dos fungos na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} , utilizando-se um micro-atomizador marca Paasche "VL", sendo utilizadas 2 ml da suspensão por tratamento, em cinco folhas de algodoeiro. Após a pulverização, as folhas foram mantidas por 1h para secar e em seguida expostas às ninfas de 5º instar e adultos do predador para caminhamento durante 24h. Finalmente os predadores foram transferidos para potes plásticos recebendo presas e umidade. Os potes foram acondicionados em câmara climatizada tipo BOD a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e 12h de fotofase. Este experimento foi efetuado em delineamento experimental, com número de tratamentos, repetições e insetos semelhantes ao tratamento tóxico.

As avaliações de mortalidade de ninfas e adultos de *P. nigrispinus* foram realizadas diariamente durante 10 dias. Os insetos mortos foram transferidos para câmara úmida e mantidos à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h para confirmação do agente causal.

Tratamento pela predação de presa infectada. Neste experimento, foram utilizados os isolados 561 de *B. bassiana* e 866 de *M. anisopliae*, os quais se mostraram mais agressivos ao predador nos experimentos de contato tóxico e caminhamento em folhas tratadas com os fungos. Lagartas de 3º instar de *A. argillacea* foram pulverizadas com os fungos na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} , e confinadas em tubos de PVC contendo folhas de algodoeiro cultivar CNPA Precoce 1. Dois dias após a pulverização, foram oferecidas como presa para ninfas de 5º instar do predador (< 24h) por 24h. As ninfas foram mantidas sem alimentação nas 24h anteriores, para indução do consumo das lagartas oferecidas. A testemunha foi alimentada com lagartas de *A. argillacea* sadias. Após esse período, as ninfas receberam pupas sadias de *T. molitor* como alimento. As observações foram realizadas diariamente, anotando-se a data da emergência dos adultos e ou mortalidade de ninfas. Dez casais provenientes de ninfas tratadas (i.e., tratamento ninfadulto) foram acasalados e mantidos em potes plásticos de 500 ml para avaliação da fecundidade e longevidade, nas condições de laboratório de $65 \pm 5\%$ de UR, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h.

O experimento foi efetuado em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição composta por um casal de *P. nigrispinus*. Para cada tratamento, observou-se a longevidade das fêmeas, período de pré-oviposição e número total de ovos.

A alimentação sobre presas contaminadas na fase adulta foi realizada utilizando 10 casais de *P. nigrispinus* provenientes da criação com 48h de idade. Machos e fêmeas permaneceram por 24h sem alimentação, sendo então, alimentados com lagartas de 3^o ínstar de *A. argillacea* tratadas com os isolados 561 de *B. bassiana* e 866 de *M. anisopliae* na concentração de 10^7 conídios ml⁻¹ por 24h. A testemunha foi alimentada com lagartas de *A. argillacea* sadias. Findo esse período, os adultos foram acasalados e mantidos em potes plásticos de 500 ml para estudo da capacidade reprodutiva e longevidade, nas condições de laboratório de $65 \pm 5\%$ de UR, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h. O experimento foi efetuado em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e dez repetições, sendo um casal por repetição.

Análise estatística. A mortalidade provocada em cada repetição pelos isolados foi corrigida pela mortalidade natural na testemunha usando-se a fórmula de Abbott (1925). Os resultados de mortalidade corrigida e mortalidade confirmada foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o PROC GLM do SAS (SAS Institute 2000) para cada via de contato (i.e., tratamento tópico, residual e ingestão), desde que estes foram instalados em experimentos separadamente. Os resultados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para atender os requisitos da ANOVA. Na ANOVA foram considerados como fatores principais os fungos (*Metarhizium* e *Beauveria*), estágios do predador (ninfas e adultos) e isolados dos respectivos fungos com no máximo uma interação tripla (fungo x estágio x isolado) para cada via de interação. Os resultados de mortalidades obtidas nos tratamentos para efeito de comparação dos fungos e estágios do predador foram submetidos ANOVA e interpretados pelo teste de Fisher (F), pois apresentam um grau de liberdade para efeito de comparação dos tratamentos. Os resultados de mortalidade ocasionada pelos isolados dos fungos foram submetidos a ANOVA e, quando significativos, submetidos ao teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade para separação das médias dos isolados.

Resultados e Discussão

Viabilidade e patogenicidade dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. A viabilidade dos conídios dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* utilizados nos experimentos foram superiores a 95%. Os fungos foram patogênicos a lagartas de *D. saccharalis*, com porcentagem de mortalidade confirmada de 50, 55 e 85% respectivamente para os isolados 634, 561 e 604 de *B. bassiana* e de 55, 55 e 85% para os isolados 1022, 866 e 1189 de *M. anisopliae*.

Tratamento tópico de ninfas e adultos de *P. nigrispinus*. A mortalidade corrigida do predador sob tratamento tópico foi significativamente dependente do estágio do predador ($P < 0,0001$; $F = 39,83$; $Gl = 1, 48$), com maior mortalidade

para ninfas ($49,8 \pm 5,91\%$) que para adultos ($12,3 \pm 3,32\%$). Além disso, o fungo utilizado apresentou efeito significativo ($P = 0,0358$; $F = 4,66$; $Gl = 1, 48$), sendo que *M. anisopliae* ocasionou maior mortalidade corrigida ($37,5 \pm 6,52\%$) para o predador (ninfas e adultos) comparado a *B. bassiana* ($24,6 \pm 4,98\%$) (Fig. 1). Da mesma forma, os isolados dos fungos apresentaram virulências diferentes para ninfas e adultos do predador ($P = 0,0310$; $F = 2,74$; $Gl = 1, 48$). Isolados de *M. anisopliae* causaram mortalidades corrigidas de 52% a 72% e de 4% a 13% para ninfas e adultos, respectivamente, enquanto que *B. bassiana* promoveu mortalidades de 17% a 59% e de 4% a 27% respectivamente para ninfas e adultos.

Entre as interações estágio do predador, fungo e seus respectivos isolados, somente fungo e estágio do predador apresentaram interações significativas ($P = 0,0050$; $F = 8,67$; $Gl = 1, 48$). Esse resultado é justificado pelo fato que o fungo *M. anisopliae* ocasionou maiores porcentagens de mortalidades para ninfas (52% a 72%) que *B. bassiana* (17% a 59%). Porém as diferenças nas mortalidades de adultos infectados com *B. bassiana* não foram tão acentuadas quanto para ninfas variando de 4% a 27% (Tabela 2).

As ninfas do predador foram mais susceptíveis ao parasitismo pelo tratamento tópico (49,8%) em comparação aos predadores adultos (12,3%). Esse resultado também

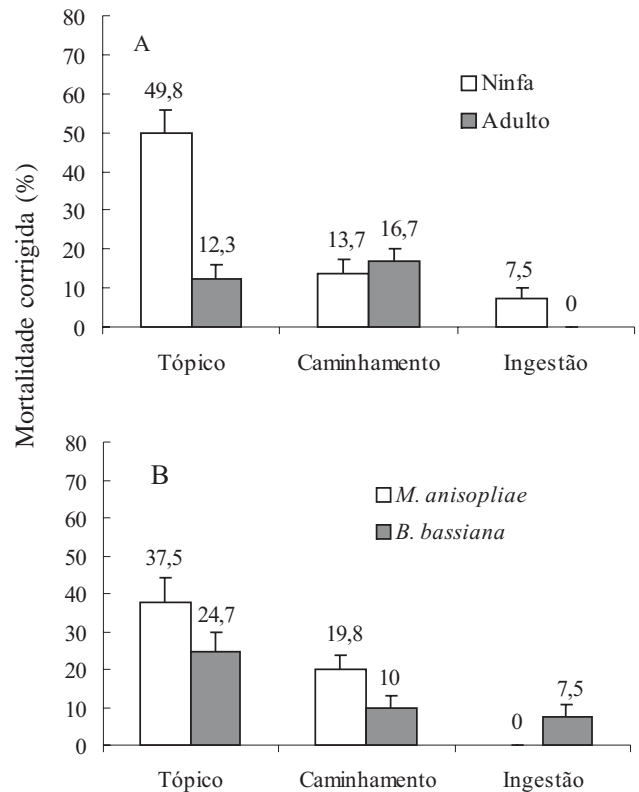


Fig. 1. Mortalidade (%) de ninfas e adultos de *P. nigrispinus* relativa aos efeitos principais das interações idade do predador (A) e fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* (B) em contato tópico, caminhamento em folhas tratadas e ingestão de presa contaminada.

Tabela 2. Mortalidades corrigida e confirmada (%) (média \pm EP) para ninfas de 5ª instar e adultos de *P. nigrispinus* contaminados por tratamento tópico com diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} (26 ± 1 °C, UR de $74 \pm 4\%$ e fotoperíodo de 12h).

Fungo	Estágio do predador	Isolado	Mortalidade corrigida	Mortalidade confirmada
<i>M. anisopliae</i>	Ninfa	866	72,0 \pm 4,72 A a	32,0 \pm 4,16 A
		1022	71,0 \pm 7,53 A a	8,0 \pm 3,26 B
		1189	52,0 \pm 1,52 AB abc	16,0 \pm 3,99 AB
	Adulto	866	13,0 \pm 3,39 BC bc	- ¹
		1022	13,0 \pm 3,39 BC bc	-
		1189	4,0 \pm 1,63 C c	-
<i>B. bassiana</i>	Ninfa	561	59,0 \pm 5,56 A ab	-
		604	28,0 \pm 5,53 AB abc	12,0 \pm 1,99
		634	17,0 \pm 1,77 AB bc	-
	Adulto	561	4,0 \pm 1,63 B c	-
		604	13,0 \pm 3,39 B bc	-
		634	27,0 \pm 5,06 AB abc	-

Letras maiúsculas, na coluna, comparam somente médias de isolados dentro de cada fungo para ninfas e adultos (*Metarhizium*, $F = 9,04$; $GI = 5, 24$; $P < 0,0001$; *Beauveria*, $F = 3,47$; $GI = 5, 24$; $P = 0,0168$). Letras minúsculas, na coluna, comparam médias entre todos os isolados para ninfas e adultos ($F = 6,14$; $GI = 11, 48$; $P < 0,0001$). Separação de médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey HSD ($P = 0,05$).

¹Não houve conidiogênese para confirmação do agente causal.

predominou para as espécies de fungo estudadas, sendo que ninfas do predador apresentaram mortalidade de 34,7% e 65%, comparadas a 14,7% e 10% para adultos, quando tratadas com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente.

A confirmação da mortalidade dos predadores pelo fungo foi significativa em função dos fungos ($F = 6,72$; $P = 0,0126$; $GI = 1, 48$), dos estágios do predador ($F = 16,06$; $P = 0,0002$; $GI = 1, 48$) e da interação fungo e estágio do predador ($F = 6,72$; $P = 0,0126$; $GI = 1, 48$). O efeito principal dos isolados na ANOVA e respectivas interações duplas e triplas não foram significativas ($P > 0,05$). O fungo *M. anisopliae* causou maior mortalidade confirmada ($9,3 \pm 3,28\%$) em comparação a *B. bassiana* ($2 \pm 1,11\%$). Todos os isolados de *M. anisopliae* parasitaram ninfas de *P. nigrispinus*, destacando o isolado 866 com maior porcentagem de mortalidade confirmada (Tabela 2) e, somente o isolado 604 de *B. bassiana*, apresentou mortalidade confirmada para ninfas do predador.

Tratamento de ninfas e adultos de *P. nigrispinus* através do caminhamento em folhas tratadas. Para o efeito dos fungos, estágios do predador e isolados, somente o efeito principal do fungo foi parcialmente significativo ($F = 3,37$; $P = 0,0727$; $GI = 1, 48$), ou seja, *M. anisopliae* ocasionou maior mortalidade corrigida ($19,8 \pm 4,13\%$) do predador (ninfas e adultos) que *B. bassiana* ($10 \pm 3,05\%$) em contato com os fungos nas folhas tratadas. Os isolados de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* não diferiram entre si e causaram

mortalidades corrigidas variando de 4% a 25% e de 13% a 28% para ninfas e adultos, respectivamente (Tabela 3).

A diferença na mortalidade confirmada foi significativa entre os fungos estudados ($P = 0,0108$, $F = 7,04$, $GI = 1, 48$), com confirmação somente para *M. anisopliae* (Tabela 3). Da mesma forma, entre os estágios do predador, a confirmação de parasitismo por *M. anisopliae* foi somente observada para ninfas ($P = 0,0108$, $F = 7,04$, $GI = 1, 48$). Todos os isolados de *M. anisopliae* proporcionaram mortalidade confirmada sobre ninfas, variando de 8% a 16%, porém não diferindo entre si (Tabela 3).

O tratamento tópico de ninfas ocasionou maior mortalidade que o tratamento residual sendo o isolado 866 de *M. anisopliae* o de maior impacto apresentado mortalidade corrigida e confirmada de 72% e 32%, respectivamente (Tabela 2). Resultados que suportam a maior prevalência de infecções por fungos no estágio ninfal foram encontrados por Todorova *et al.* (2002), que verificaram que isolados de *B. bassiana* aplicados na concentração de 10^6 conídios ml^{-1} , causaram mortalidades de 11% a 77% sobre ninfas de 2ª instar do percevejo predador *P. bioculatus*, em laboratório. Segundo Alves (1986) o efeito do entomopatígeno sobre o inseto é dependente do isolado utilizado, explicando a variação no grau de virulência dos isolados utilizados nesses experimentos. Sosa-Gómez & Moscardi (1998) mencionam a importância de estudar o efeito de diversos isolados sobre a praga-alvo, mas também sobre os insetos benéficos, selecionando em seguida os

Tabela 3. Mortalidades corrigida e confirmada (%) (média ± EP) de ninfas de 5º instar e adultos de *P. nigrispinus* contaminadas por caminhamento em folhas tratadas com diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} (26 ± 1 °C, UR de $74 \pm 4\%$ e fotoperíodo de 12h).

Fungo	Estágio do predador	Isolado	Mortalidade corrigida	Mortalidade confirmada
<i>M. anisopliae</i>	Ninfa	866	13,0 ± 3,39	8,0 ± 3,26
		1022	28,0 ± 5,71	12,0 ± 3,26
		1189	18,0 ± 4,54	16,0 ± 3,05
	Adulto	866	20,0 ± 4,99	- ¹
		1022	25,0 ± 4,56	-
		1189	15,0 ± 2,49	-
<i>B. bassiana</i>	Ninfa	561	8,0 ± 3,26	-
		604	8,0 ± 3,26	-
		634	4,0 ± 1,63	-
	Adulto	561	5,0 ± 2,04	-
		604	10,0 ± 2,49	-
		634	25,0 ± 4,56	-

Comparação entre médias de mortalidade corrigida para isolados ($P > 0,05$), estágio do predador ($P > 0,05$) e fungo ($F = 6,14$; $Gl = 11, 48$; $P < 0,0001$) e, para mortalidade confirmada de ninfas entre os isolados do fungo *Metarhizium* ($F = 0,26$; $P = 0,7746$; $Gl = 2, 12$).

¹Não houve conidiogênese para confirmação do agente causal.

isolados que causam menor impacto sobre a entomofauna benéfica. Assim, neste estudo ficou caracterizado que o fungo *B. bassiana* foi de baixo impacto para o percevejo predador *P. nigrispinus*.

Predação de presas contaminadas (ninfas e adultos). A ingestão de presa tratada com *B. bassiana* proporcionou 7,5% de mortalidade corrigida de ninfas, por ocasião da emergência de adultos (Fig. 1A), enquanto ninfas alimentadas com presas tratadas com *M. anisopliae* não apresentaram mortalidade (Fig. 1B). Da mesma forma, a ingestão de presa tratada com ambos fungos não ocasionou mortalidade de adultos até 10 dias após alimentação.

O período de pré-oviposição, a longevidade e a taxa de oviposição diária de fêmeas de *P. nigrispinus* alimentadas com lagartas de *A. argillacea* previamente tratadas com os fungos, tanto nas fases de ninfa e adulto não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 4). No entanto, parcial significância foi obtida para a fecundidade de fêmeas ($F = 2,14$; $P = 0,0714$, $Gl = 5, 52$). Esse efeito foi caracterizado basicamente pelo estágio do predador (tratamento de ninfas ou adultos) ($F = 9,27$; $P = 0,0036$; $Gl = 1, 52$). Tanto para *M. anisopliae* como para *B. bassiana*, o tratamento desde a fase de ninfas afetou a produção de ovos das fêmeas (Tabela 4). No entanto, os valores variaram próximo a resultados obtidos em outros estudos para fêmeas do predador alimentadas com lagartas do curuquerê-do-algodoeiro (Medeiros et al. 2000). Apesar de não haver diferença significativa, a menor fecundidade das fêmeas alimentadas com presas infectadas na fase de ninfa, comparada à das

fêmeas alimentadas com presas tratadas somente na fase adulta, pode ter decorrido da alimentação em presas de qualidade inferior (infectadas com hifas e blastósporos), menor consumo de alimento e ausência de presa por 24h antes da oferta das presas tratadas, situação essa última que ocorreu em todos os tratamentos. Ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus* requerem alimentação abundante para o desenvolvimento de tecidos e órgãos para a emergência dos adultos. Por outro lado, esperava-se que a ingestão de presas contaminadas pelo fungo devido à ação de metabólitos tóxicos causasse maior impacto nos parâmetros reprodutivos de *P. nigrispinus*. No entanto, a reação alcalina ou ácida do conteúdo intestinal dos insetos pode ser uma das causas de eliminação de muitos microrganismos potencialmente patogênicos (Alves 1998), o que poderá ter minimizado a ação desses fungos sobre parâmetros considerados. Além disso, percevejos predadores possuem digestão extra-oral e usam um complexo enzimático para digerir os tecidos e órgãos das presas para posterior ingestão na forma semi-líquida (Cohen 1990, Stamopoulos et al. 1993, Cohen 2000), possivelmente reduzindo a viabilidade do fungo antes mesmo de sua ingestão, o que precisa ser investigado.

Trabalhos visando detectar a ocorrência e a patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre populações naturais de pentatomídeos fitófagos demonstraram baixa mortalidade natural de ninfas e adultos de *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildinii* (Westw.) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Euchistus heros* (F) (Hemiptera: Pentatomidae) por esses fungos, o que foi confirmado em testes de laboratório

Tabela 4. Parâmetros reprodutivos (média \pm EP) de *P. nigrispinus* alimentados com lagartas de *A. argillacea* tratadas com *M. anisopliae* e *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} ($27 \pm 1^\circ \text{C}$, UR de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 12h).

Parâmetros	<i>B. bassiana</i>		<i>M. anisopliae</i>		Testemunha	
	Adulto/ninfa ¹	Adulto	Adulto/ninfa ¹	Adulto	Adulto/ninfa	Adulto
Pré-oviposição (dias)	3,5 \pm 0,70	3,5 \pm 0,84	3,5 \pm 0,47	4,4 \pm 1,21	4,5 \pm 1,09	4,9 \pm 1,10
No. de ovos/fêmea	196,5 \pm 31,28 b	309,2 \pm 61,26 ab	191,8 \pm 35,57 b	371,6 \pm 75,94 ab	298,6 \pm 63,02 ab	427,0 \pm 58,02 a
No. de ovos/fêmea/dia	5,6 \pm 1,56	7,6 \pm 1,14	5,5 \pm 2,09	8,4 \pm 0,89	4,9 \pm 0,79	8,8 \pm 1,30
Longevidade (dias)	43,7 \pm 7,84	39,4 \pm 6,76	52,8 \pm 7,65	43,6 \pm 6,91	57,6 \pm 7,15	53,9 \pm 5,42

Médias (\pm EP), na linha, com diferente letras diferem entre si pelo teste de Duncan MRT ($P < 0,05$) e, médias não seguidas por letras não apresentam diferença entre os tratamentos pela ANOVA.

¹Adulto/ninfa - Adultos provenientes de ninfas alimentadas com lagartas de *A. argillacea* infectadas com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*.

(Moscardi *et al.* 1988). Alguns autores sugerem que percevejos são naturalmente resistentes a infecções por *B. bassiana* (Sosa-Gómez & Moscardi 1998), o que explica a baixa infecção do predador *P. nigrispinus* por isolados desse entomopatógeno. No entanto, a mortalidade observada pode ser relativamente alta quando obtida sobre agentes de controle biológico em se tratando de segurança para uso integrado com inimigos naturais no manejo de pragas.

Com relação ao tratamento de adultos do predador, em nenhum dos experimentos houve confirmação de mortalidade por infecção. Isto pode ser devido à inibição da germinação dos conídios relatada por Borges *et al.* (1993), que estudaram o efeito do feromônio de alarme de *N. viridula* sobre o fungo *M. anisopliae* e demonstraram que esse composto inibe a germinação dos conídios do fungo em meio de cultura artificial. Na mesma linha, Sosa-Gómez & Moscardi (1997), examinando o mecanismo de adesão de *M. anisopliae* sobre *N. viridula*, observaram que o processo foi facilitado devido à presença de lipídios na cutícula do percevejo. Também, foram identificados elevados níveis do aldeído (E) 2-decenal em extratos cuticulares do percevejo, componente relatado como inibidor da germinação de conídios aderidos a *N. viridula*. Assim, apesar da constatação de mortalidade para o predador na fase de ninfa com os entomopatógenos nesse trabalho, os índices de confirmação de mortalidade também foram baixos, possivelmente devido à ação desse composto sobre o fungo também no momento da conidiogênese.

Considerando-se as vias de exposição de ninfas e adultos do predador aos fungos, o tratamento tópico proporcionou maior taxa de infecção e mortalidade para ambos os fungos, sendo as ninfas do predador mais susceptíveis que adultos (Fig. 1). A diferença em susceptibilidade entre ninfas e adultos parece ser comum entre pentatomídeos (Soza-Gómez & Moscardi 1997, Todorova *et al.* 2002). Além disso, os resultados encontrados nesse trabalho mostraram que, quando o tratamento foi feito através de predação de presa infectada, os fungos tiveram pouco impacto sobre o desenvolvimento e reprodução do predador se comparados

com o tratamento tópico. A ação dos fungos entomopatogênicos estudados sobre o *P. nigrispinus* caracteriza que ninfas desse predador apresentam suscetibilidade diferenciada aos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Também reforça a característica de amplo espectro de hospedeiros desses fungos o que sugere cuidadoso critério no uso integrado com o percevejo predador *P. nigrispinus* quando se deseja preservar o controle exercido por ambos.

Agradecimentos

A José Eudes Moraes de Oliveira (UNESP - Jaboticabal), pelo fornecimento de posturas de *P. nigrispinus* e a Francisco S. Ramalho Embrapa - Algodão pelo fornecimento de pupas do curuquerê-do-algodoeiro utilizadas para iniciar as colônias. Ao CNPq, pela bolsa concedida ao primeiro autor, ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade/Entomologia da UFRPE.

Referências

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Alves, S.B. 1986. Patologia geral, p.3-70. In Alves, S.B. (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Manole, 407p.
- Alves, S.B. 1992. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 77-86.
- Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p.289-381. In Alves, S.B. (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Batista Filho, A. 1989. Controle biológico e o manejo integrado de pragas. *Biológico* 55: 36-39.
- Borges, M., S.C.M. Leal, M.S.T. Tigano-Milani & M.C.C. Valadares. 1993. Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)

- Sorok. An. Soc. Entomol. Brasil 22: 505-512.
- César Filho, E., E.J. Marques & R. Barros. 2002. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para lagartas de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818). Sci. Agric. 59: 457-462.
- Cohen, A.C. 1990. Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. Ann. Entomol. Soc. Am. 83: 1215-1223.
- Cohen, A.C. 2000. How carnivorous bugs feed, p.563-570. In C.W. Schaefer & A.R. Panizzi (eds.), Heteroptera of economic importance. Boca Raton, CRC Press, 828p.
- Cook, R.J., W.L. Bruckart, J.R. Coulson, M.S. Goettel, R.A. Humber, R.D. Lumsden, J.V. Maddox, M.L. Mcmanus, L. Moore, S.F. Meyer, P.C. Quimby Jr., J.P. Stack. & J.L. Vaughn. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. Biol. Control 7: 333-351.
- Driessche, R.G. Van & T.S. Bellows Jr. 1996. Biological control. New York, Chapman & Hall, 539p.
- Goettel, M.S., T.J. Poprawski, J.D. Vandenberg, Z. Li & D.W. Roberts. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents, p.209-231. In M. Laird, L.A. Lacey & E.W. Dawson. (eds.), Safety of microbial insecticides safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. Boca Raton, CRC Press, 259p.
- Gravena, S. 2000. Os fungos no controle de insetos. Rev. Cultivar 15: 41-43.
- Gravena, S. & H.F. Cunha. 1991. Predator of cotton leafworm first instar larvae, *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae). Entomophaga 36: 481-491.
- Harper, J.D. & G.R. Carner. 1996. Biology, ecology and epidemiology of microbial organisms infecting arthropods, p.163-202. In E.G. King, J.R. Phillips & R.J. Coleman (eds.), Cotton insect and mites: Characterization and management. Memphis, The Cotton Foundation Publisher, 1008p.
- James, R.R. & B. Lighthart. 1994. Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomogenous fungi. Environ. Entomol. 23: 190-192.
- Magalhães, B.P., J.C. Lord, S.P. Wraight, R.A. Daoust & D.W. Roberts. 1988. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriopis connexa*. J. Invert. Pathol. 52: 471-473.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, W.P. Lemos & J.C. Zanuncio. 2000. Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). J. Appl. Entomol. 124: 319-324.
- Moscardi, F., B.S. Corrêa-Ferreira, M.C. Diniz & I.L.S. Bono. 1988. Incidência estacional de fungos entomógenos sobre populações de percevejos pragas da soja. In: Resultados de pesquisa de soja. 1986-1987. EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Londrina, 90p.
- Ramalho, F.S. 1994. Cotton pest management. Part 4 - A Brazilian perspective. Annu. Rev. Entomol. 39: 563-578.
- Robbs, C.F. & A.M. Bittencourt. 1998. Controle biológico de insetos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 6: 71p.
- SAS Institute. 2000. SAS User's guide: Statistics version 8.02 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, NC, s.p.
- Sosa-Gómez, D.R. & F. Moscardi. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J. Invert. Pathol. 69: 31-39.
- Sosa-Gómez, D.R. & F. Moscardi. 1998. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. J. Invert. Pathol. 71: 115-120.
- Stamopoulos, D.C., C. Diamantidis & A. Chloridis. 1993. Activités enzymatiques du tube digestif du prédateur *Podisus maculiventris* (Hem.: Pentatomidae). Entomophaga 38: 493-499.
- Todorova, S.I., J.C. Côté & C. Coderre. 2002. Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromyotina: Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). J. Appl. Entomol. 126: 182-185.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & T.V. Zanuncio. 1996. Produção e uso de percevejos predadores no controle de pragas florestais, p.41-51. In Workshop sobre Proteção Florestal do Mercosul. Santa Maria, CECET/UFSM, 80p.
- Zanuncio, J.C., R.N.C. Guedes, H.N. Oliveira & T.V. Zanuncio. 2002. Uma década de estudos com percevejos predadores: Conquistas e desafios, p.495-509. In J.R. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, 635p.

Received 06/X/05. Accepted 05/XI/05.