

Susceptibilidade de *Cydia splendana* ao fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana*

Ivo Oliveira¹, Paula Baptista¹; Teresa Lino-Neto², Albino Bento¹, José A. Pereira^{1*}

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO) / Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855. E-mail: jpereira@ipb.pt

²Centro para a Biodiversidade e Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG)/Centro de Biologia Funcional de Plantas, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

Resumo

Os fungos entomopatogénicos têm-se revelado uma alternativa promissora aos produtos químicos usados na luta contra pragas. Apesar do grande esforço empreendido na sua utilização, o seu efeito num grande número de pragas é ainda desconhecida. O bichado da castanha, *Cydia splendana* L., é a principal praga do castanheiro no norte de Portugal, causando prejuízos consideráveis. A utilização de meios de luta químicos apresenta limitações devido, por um lado, ao número reduzido de substâncias homologadas, e por outro porque a utilização de pesticidas de síntese não se coaduna com o modo de produção sustentável em que os soutos são conduzidos na região. Adicionalmente os meios de luta culturais e biotécnicos têm-se revelado de difícil implementação e de eficácia reduzida. Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar a susceptibilidade de *C. splendana* ao fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana*. Testou-se o efeito de quatro isolados (A39GF09; A67GF09; LC39GF10 e PA95GF10) da coleção do IPB, obtidos de larvas do lepidóptero *Prays oleae* recolhidos na região de Trás-os-Montes. Para tal em laboratório, foram inoculadas larvas de *C. splendana*, pelo método de superfície, com seis concentrações de conídios (1×10^5 ; 1×10^6 ; 5×10^6 ; 1×10^7 ; 5×10^7 ; 1×10^8). Os quatro isolados de *B. bassiana* testados demonstraram capacidade para infectar as larvas de *C. splendana*. A mortalidade confirmada apresentou uma correlação linear positiva com a concentração de conídios, embora com diferenças entre isolados. O Tempo Letal médio (LT₅₀) e a Concentração Letal média (LD₅₀) foram também variáveis entre isolados. A LD₅₀ variou entre $< 1 \times 10^5$ (LC39GF10) e $2,13 \times 10^5$ (A67GF09), enquanto que LT₅₀ variou entre < 5 e 10 dias. A acção dos isolados de *B. bassiana* testados sobre *C. splendana*, apesar da grande variabilidade observada, abre a possibilidade do seu uso na luta biológica contra esta praga do castanheiro.

Palavras-chave: *Cydia splendana*; *Beauveria bassiana*; Luta biológica, Variabilidade.

Susceptibility of *Cydia splendana* to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*

Abstract

Entomopathogenic fungi are one of the most promising alternatives to the use of chemical pesticides. Although a considerable amount of knowledge is available on this kind of fungi, their effect in a great number of pests is still unknown. The chestnut fruit moth, *Cydia splendana* L., is one of the major pests of chestnut in northern Portugal, able to cause severe damage. The chemical control has several limitations either due to the limited number of approved substances or because the use of chemical pesticides is not consistent with the sustainable mode of production in which the groves are conducted in the region. Additionally, both cultural and biotechnical controls have proven to be difficult to implement and to have reduced efficacy. This works intends to evaluate the susceptibility of *C. splendana* to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. The four isolates tested (A39GF09; A67GF09; LC39GF10 and PA95GF10) were obtained from the IPB collection and were isolated from *Prays oleae* larvae collected in the Trás-os-Montes region. For this, *C. splendana* larvae were inoculated, following the surface method, with six concentrations of conidia (1×10^5 ; 1×10^6 ; 5×10^6 ; 1×10^7 ; 5×10^7 ; 1×10^8). Larvae of *C. splendana* showed to be susceptible to infection by all four *B. bassiana* isolates. A concentration-dependent mortality was observed, although with variation between isolates. Median lethal time (LT₅₀) and median lethal concentration (LD₅₀) also varied between isolates. LD₅₀ varied from $< 1 \times 10^5$ (LC39GF10) to 2.13×10^5 (A67GF09) while LT₅₀ ranged from < 5 to 10 days. These results show an expected variation between isolates of *B. bassiana*, and, more importantly, the susceptibility of *C. splendana* to this entomopathogenic fungus, which open up the possibility of its used to control this particular pest.

Keywords: *Cydia splendana*; *Beauveria bassiana*; Biological control; Variability

Introdução

O castanheiro é uma cultura com importância económica nos países da Europa mediterrânica, pela qualidade da madeira e pelo valor do fruto (a castanha). Na Península Ibérica, a área ocupada com castanheiros é cerca de 44 000 ha, originando uma produção de mais de 23 000 toneladas de castanha anuais (FAO, 2011).

Esta cultura é afetada por diversas pragas de insetos, sendo a principal o bichado da castanha, *Cydia splendana* Hübner (Lepidoptera: Tortricidae) (Bento et al., 2007). Os estragos provocados por esta praga resultam da formação de pequenas galerias no interior do fruto resultante do desenvolvimento da fase larvar de *C. splendana*. As castanhas infestadas com as larvas perdem todo o valor comercial, podendo os estragos atingir os 80% da produção (Bento et al., 2007). Os atuais meios de luta desta praga, luta cultural e biotécnica, não são suficientemente eficazes. Para além disso, existe um número reduzido de produtos químicos homologados (Aguin-Pombo et al., 2009), e a sua aplicação é limitada em modos de produção sustentável, levando à necessidade de desenvolvimento/aplicação de meios de luta alternativos, sendo a luta biológica um dos meios a considerar.

Uma destas alternativas poderá ser o uso de fungos entomopatogénicos. Apesar de não haver ainda informação sobre a presença destes fungos em soutos, existem dados que mostram a sua capacidade de infetar insetos da mesma família de *C. splendana* (Ihara et al., 2009; Anhalt et al., 2010; Goble et al., 2011). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de *Beauveria bassiana*, um dos fungos entomopatogénicos mais estudados com capacidade de infetar lepidópteros (Inclán et al., 2008; Safavi et al., 2010; Wraight et al., 2010; Maniania et al., 2011), de atuar como agente de luta biológica contra *C. splendana*.

Material e Métodos

Insetos: Para a realização dos ensaios biológicos foram recolhidas, numa empresa de processamento de castanha, larvas de *Cydia splendana* no quarto instar, colocadas em sacos de até à sua utilização.

Estirpes fúngicas: Foram selecionados quatro isolados do fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana* (A67GF09; A39GF09; PA95GF10 e LC39GF10) obtidos previamente, de larvas e pupas de *Prays oleae* Bern. apresentando sinais de infecção por fungo (Oliveira et al., 2012) e encontram-se depositados na Coleção de Culturas da Escola Agrária, do Instituto Politécnico de Bragança. A identificação dos isolados foi conseguida através da amplificação e sequenciação da região Espaço Transcrita Interna (ITS) do DNA ribossomal (rDNA), usando os iniciadores oligonucleotídicos universais ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). A edição das sequências obtidas foi efetuada pelo programa *EditSeq* (DNASTAR) e o seu alinhamento foi efetuado pelo método ClustalW através do programa *MegaAlign* (DNASTAR). Recorrendo ao servidor NCBI e utilizando o algoritmo BLAST, foi analisada a homologia das sequências obtidas com outras sequências presentes na base de dados GenBank.

Bioensaio: Foram preparadas seis concentrações de suspensões de conídios (1×10^5 ; 1×10^6 ; 5×10^6 ; 1×10^7 ; 5×10^7 ; 1×10^8 conídios/ml) de cada isolado, em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,02%, v/v), e recipientes plásticos de fundo redondo (8 cm de diâmetro e 5 cm de altura) forrados na base com papel de filtro estéril (Whatman nº 4). Para cada concentração pipetou-se 1 ml de solução de esporos que foi vertido no papel de filtro onde foram colocadas 10 larvas de *C. splendana*. Como controlo, utilizou-se solução aquosa estéril de Tween 80 (0,02%, v/v). Foram feitas 5 repetições de cada tratamento (total de 50 larvas por concentração). O ensaio foi conduzido em câmara de cultura com temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), humidade (55-65%), e fotoperíodo (16:8 h/ luz:escuro) controlados. Após condução do ensaio procedeu-se à confirmação do agente causal da mortalidade.

Análise de dados: A mortalidade das larvas foi monitorizada ao fim de 25 dias. Para a avaliação de virulências dos isolados testados, foram calculados o Tempo Letal Médio (LT₅₀), para a concentração mais elevada testada (1 x 10⁸ conídios/ml) e a Concentração Letal Média (LD₅₀). O valor de LT₅₀ indica o tempo estimado para causar a mortalidade de 50% das larvas, sendo o LC₅₀ a estimativa da concentração necessária para causar mortalidade a 50% das larvas. Para o tratamento de dados recorreu-se ao software SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 19.0 (IBM Corporation, New York, U.S.A.).

Resultados e Discussão

As sequências nucleotídicas correspondentes à região ITS do rDNA nuclear dos quatro isolados fúngicos A67GF09; A39GF09; PA95GF10 e LC39GF10, encontram-se representadas na figura 1. Estas sequências compreendem, em média, 520 pb e incluem a região ITS1, ITS2 e a região codificante correspondente ao gene 5,8S. Ambas as regiões ITS1 e ITS2 não se encontram completas, devido à utilização dos iniciadores ITS1 e ITS4 que não flanqueiam essas regiões na totalidade. A análise comparativa destas sequências nucleotídicas com regiões ITS do rDNA de outras espécies fúngicas revelou valores de identidade de 99,0% com a *B. bassiana* (nº de acesso JX149538.1) permitindo assim a sua identificação.

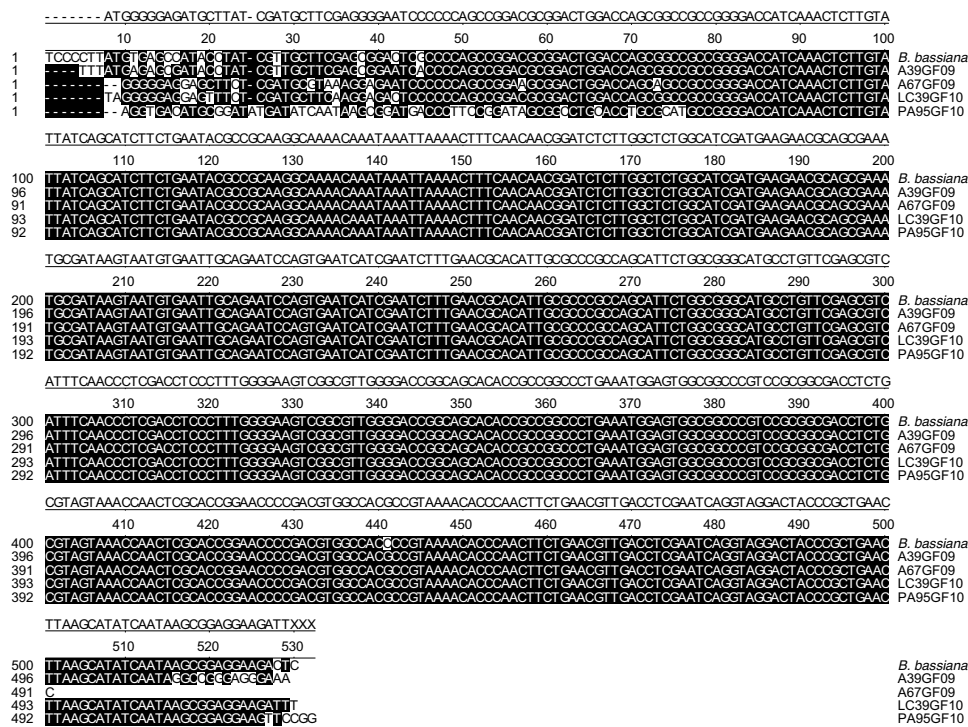


Figura 1. Alinhamento de sequências nucleotídicas, que flanqueiam os iniciadores oligonucleotídicos ITS1 e ITS4, dos isolados fúngicos autóctones estudados e de uma sequência de *Beauveria bassiana* retirada da base de dados NCBI (nº de acesso JX149538.1). Os resíduos nucleotídicos conservados encontrados nas sequências analisadas estão sombreadas a preto.

Beauveria bassiana, é uma das espécies de fungos entomopatogénicos mais estudadas, e conhecida por infetar um grande número de espécies de insetos, encontrando-se disponíveis no mercado formulações comerciais baseadas neste fungo para a sua utilização como agente de luta biológica (Shah and Pell, 2003; Faria and Wright, 2007). Este fungo ataca também um conjunto de lepidópteros que são pragas de diferentes culturas (Inclán et al., 2008; Safavi et al., 2010; Wraight et al., 2010;

Maniania et al., 2011; Oliveira et al., 2012). Os resultados observados no presente trabalho mostram que os isolados testados, nas concentrações testadas, têm a capacidade de infetar e provocar mortalidade em larvas de *C. splendana* (Figura 2). A mortalidade registada no controlo, em que foi utilizada uma solução aquosa estéril de Tween 80 (0,02%, v/v), aconteceu apenas após a passagem dos 25 dias de ensaio. Neste ensaio controlo, a mortalidade registada foi de apenas 4%, ao dia 27 de ensaio. Para todos os isolados foi visível uma relação de dependência entre a mortalidade ocasionada e a concentração de conídios testada, apesar de terem sido detetadas variações entre os isolados. O isolado LC39GF10 mostrou ser o mais patogénico, quando aplicado a baixas concentrações, causando cerca de 60% de mortalidade de larvas de *C. splendana*, sendo que os restantes apresentaram percentagens de mortalidade inferiores a 50% (Figura 2). Esta maior patogenicidade do isolado LC39GF10 verificou-se nas três concentrações mais baixas testadas (1×10^5 ; 1×10^6 ; 5×10^6 conídios/ml), enquanto o isolado PA95GF10 foi o que provocou a totalidade de indivíduos mortos a concentrações mais baixas (1×10^7 conídios/ml).

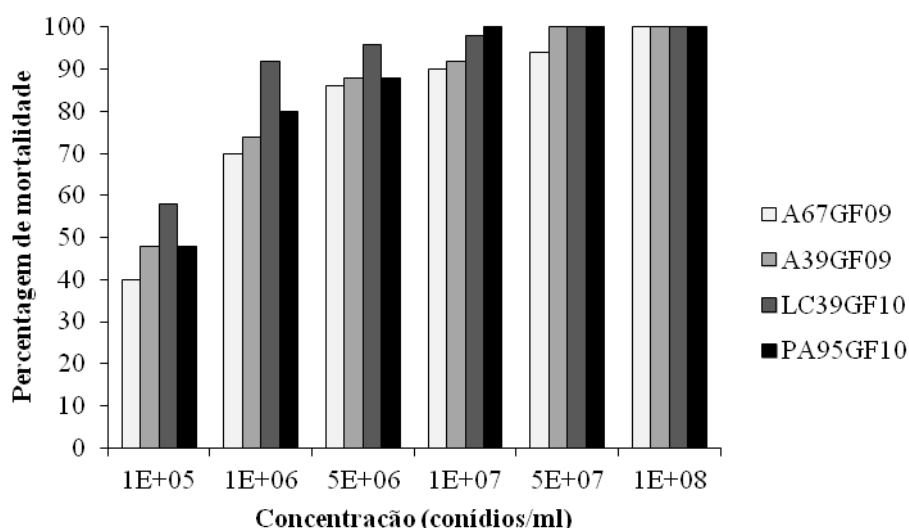


Figura 2. Percentagem de mortalidade registada ao fim de 25 dias, para cada isolado de *Beauveria bassiana*, e em cada concentração de conídios testada (conídios/ml).

Quando testados nas concentrações mais altas (5×10^7 ; 1×10^8), todos os isolados causaram 100% de mortalidade, com a exceção de A67GF09, na concentração de 5×10^7 conídios/ml, que causou a mortalidade a 94% das larvas de *C. splendana*. Este isolado apresentou, em todas as concentrações testadas, os menores valores de mortalidade. Variação na patogenicidade tem sido um aspeto observado por outros autores quando testam diferentes isolados de fungos entomopatogénicos contra lepidópteros (Safavi et al., 2010; Wraight et al., 2010; Goble et al., 2011), e mais especificamente, insetos da família Tortricidae (Goble et al., 2011), à qual *C. splendana* pertence. A avaliação da virulência dos isolados de *B. bassiana* (Tabela 1) mostrou também variação dos parâmetros de LD_{50} e LT_{50} . No primeiro caso, a concentração necessária para causar mortalidade a 50% das larvas variou entre valores inferiores a 1×10^5 conídios/ml, para o isolado LC39GF10, e $2,13 \times 10^5$ conídios/ml, relativos ao isolado A39GF09. Os restantes isolados, A67GF09 e PA95GF10 apresentaram valores semelhantes entre si, de $1,43 \times 10^5$ e $1,28 \times 10^5$, respetivamente. Valores semelhantes de LC_{50} foram obtidos por outros autores quando testaram isolados de *B. bassiana* contra *Cydia kurokoi* (Amsel) (Lepidoptera: Tortricidae), tendo Ihara et al. (2009) estimado um LC_{50} de $3,5 \times 10^5$ conídios/mL. Apesar disso, e do facto de existirem resultados sobre virulência de *B. bassiana* em lepidópteros, a comparação terá sempre de ser feita tendo sempre em conta as diferentes susceptibilidades detectadas de cada espécie de inseto (Wraight et al., 2010).

Tabela 1. Virulência de isolados de *Beauveria bassiana* contra larvas *Cydia splendana* e valores de LT_{50} (dias). Os valores entre parêntesis indicam os limites máximos e mínimos, com limites fiduciais de 95%

Isolados de <i>B. bassiana</i>	LC_{50} (conídios/ml)	LT_{50} (10^8 conídios/mL)
A39GF09	2.13×10^5 ($8.23 \times 10^4 - 4.13 \times 10^5$)	10.2 (9.2 – 11.2)
A67GF09	1.43×10^5 ($5.31 \times 10^4 - 2.81 \times 10^5$)	< 5
LC39GF10	< 1×10^5 ($1.67 \times 10^4 - 1.21 \times 10^5$)	< 5
PA95GF10	1.28×10^5 ($5.25 \times 10^4 - 2.36 \times 10^5$)	< 5

Quando estimado o tempo necessário para causar mortalidade a 50% das larvas, observou-se mais uma vez variações entre isolados (Tabela 1). Do mesmo modo que na estimativa de LD_{50} , o isolado A39GF09 apresentou os piores resultados, uma vez que o tempo necessário para causar 50% de mortalidade (LT_{50}), quando aplicado à concentração mais elevada foi de 10,2 dias, tendo sido estimado, nos outros três isolados, um LT_{50} inferior a 5 dias. Este parâmetro, para além de poder ser influenciado pela produção de enzimas, estará também correlacionado com a velocidade de germinação dos conídios, uma vez que este fator tem sido correlacionado com a virulência de fungos entomopatogénicos (Altre et al, 1999; Yeo et al., 2003), e resulta numa infecção mais rápida do inseto, e consequentemente, em valores de LT_{50} mais baixos.

As variações de patogenicidade e virulência reportadas no presente trabalho, indicam a necessidade de realizar ensaios deste tipo, de modo a avaliar a susceptibilidade de diferentes pragas a diferentes isolados. As causas destas variações podem estar relacionadas com factores associados a cada isolado, como diferentes níveis de produção de enzimas ligadas ao processo de infecção (Kaur e Padmaja, 2009; Dhar e Kaur, 2010), uma vez que estas são fatores determinantes da virulência (Bidochka e Khachatourians, 1990; Kaur e Padmaja, 2009); tamanho dos conídios, visto se terem estabelecido correlações positivas (Altre et al. 1999; Liu et al. 2003) e negativas (Samuels et al., 1989) entre a infectividade de fungos entomopatogénicos e o tamanho dos conídios; bem como condições ambientais e de adaptação às condições ecológicas da região.

Conclusões

Apesar de não existirem registos da presença de *B. bassiana* em soutos, ou da sua aplicabilidade contra *C. splendana*, o presente trabalho mostrou que este fungo entomopatogénico poderá ser útil na luta biológica contra esta praga.

Agradecimentos

Ivo Oliveira agradece à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), POPH-QREN e FSE pela bolsa de doutoramento concedida (SFRH/BD/44265/2008). Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projecto PTCD/AGR-AAM/102600/2008.

Bibliografia

Aguin-Pombo, D., Macedo, N., Aguiar, M., Pimentel, R., Ventura, L., Zorman, M. Martins, J., Horta-Lopes, D., Mexia, A. (2009). Bichado da castanha. In: Horta-Lopes, D., Cabrera-Perez, R., Borges, P., Aguin-Pombo, A., Mumford, J., Mexia, A. (Eds.). Folhas informativas. Centro de Biotecnologia dos Açores, pp. 27-30.

- Altre, J., Vandenberg, J., Cantone, F. (1999). Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* **73**, 332-338.
- Anhalt, F., Azevedo, J., Sugayama, R., Specht, A., Barros N (2010) Potential of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycetes, hypocreales) in the control of *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera, Tortricidae) and its compatibility with chemical insecticides. *Brazilian Journal of Biology* **70**, 931-936.
- Bento, A., Pereira, S., Pereira, J. (2007). Pragas associadas à castanha em Trás-os-Montes: biologia e estragos. In: II Congresso Ibérico do Castanheiro. Vila Real.
- Bidochka, M., Khachatourians, G. (1990). Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology* **56**, 362-370.
- Dhar, P., Kaur, G. (2010), Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. *African Journal of Biochemistry Research* **4**, 65-72.
- FAO: disponível em : <http://faostat3.fao.org/home>, Maio de 2013.
- Faria, M., Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* **43**, 237-256.
- Ferreira-Cardoso, J., Rodrigues, L., Gomes, E., Sequeira, C., Torres-Perreira, J. (1999). Lipid composition of *Castanea sativa* Mill. fruits of some native Portuguese cultivars. *Acta Horticulturae* **494**, 138-166.
- Goble, T., Dames, J., Hill, M., Moore, S. (2011). Investigation of native isolates of entomopathogenic fungi for the biological control of three citrus pests. *Biocontrol Science and Technology* **21**, 1193-1211.
- Goettel, M. (1995). The utility of bioassays in the risk assessment of entomopathogenic fungi. In: Biotechnology Risk assessment: USEPA/USDA/Environment Canada/Agriculture and Agri-Food Canada "Risk Assessment Methodologies." Proceedings of the Biotechnology Risk Assessment Symposium, June 6-8, Pensacola, Florida, pp 2-8.
- Ihara, F., Toyama, M., Higaki, M., Mishiro, K., Yaginuma, K. (2009). Comparison of pathogenicities of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to chestnut pests. *Applied Entomology and Zoology* **44**, 127-132.
- Inclán, D., Bermúdez, F., Alvarado, E., Ellis, M., Williams, R., Acosta, N. (2008). Comparison of biological and conventional insecticide treatments for the management of the pineapple fruit borer, *Strymon megarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) in Costa Rica. *Ecological Engineering* **34**, 328-331.
- Kaur, G., Padmaja, V. (2009). Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *Journal of Basic Microbiology* **49**, 264-274.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M., Parker, B. (2003). Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hem.: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology* **82**, 139-147.
- Maniania, N., Ouna, E., Ahuya, P., Frérot, B., Félix, A., Le Ru, B., Calatayud, P. (2011). Dissemination of entomopathogenic fungi using *Busseola fusca* male as vector. *Biological Control* **58**, 374-378.
- Oliveira, I., Pereira, A., Lino-Neto, T., Bento, A., Baptista, P. (2012). Fungal diversity associated to the olive moth, *Prays oleae* Bernard: a survey for potential entomopathogenic fungi. *Microbial Ecology* **63**, 964-974.
- Safavi, S., Kharrazi, A., Rasouljan, G., Bandani, A. (2010). Virulence of some isolates of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Journal of Agricultural Science and Technology* **12**, 13-21.
- Shah, P., Pell, J. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**, 413-423.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T. J. (ed) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wraight, S., Ramos, M., Avery, P., Jaronski, S., Vandenberg, J. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 186-199.
- Yeo, H., Pell, J., Alderson, P., Clark, S., Pye, B. (2003). Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science* **59**, 156-165.