



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA  
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**ANA PAULA MAGNO DO AMARAL**

**LAGARTAS DESFOLHADORAS DE PALMA DE ÓLEO  
BIOMORFOMETRIA E BIOCONTROLE COM FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS**

**BELÉM – PA  
2020**

**ANA PAULA MAGNO DO AMARAL**

**LAGARTAS DESFOLHADORAS DE PALMA DE ÓLEO  
BIOMORFOMETRIA E BIOCONTROLE COM FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia,  
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Fátima Vieira Batista.

**BELÉM – PA  
2020**

---

**Amaral, Ana Paula Magno do**

**Lagartas desfolhadoras de palma de óleo biomorfometria e biocontrole com fungos entomopatogênicos**

**102. f**

**Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019.**

**1. *Automeris liberia.*; 2. *Brassolis sophorae.* 3. *Elaeis guineensis***

---

**ANA PAULA MAGNO DO AMARAL**

**LAGARTAS DESFOLHADORAS DE PALMA DE ÓLEO BIOMORFOMETRIA E  
BIOCONTROLE COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências deste para obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Telma Fátima Vieira Batista – Orientadora  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Dr. Ricardo Salles Tinôco - 1º Examinador  
AGROPALMA S/A

---

Dr. Gilson Sanchez Chia – 2º Examinador  
AGROPALMA S/A

---

Dr. Alessandra Jackeline Guedes de Moraes – 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof. Dr. Anderson Gonçalves da Silva – 4º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

## AGRADECIMENTOS

A Deus, provedor de todo o bem, pela minha existência e força para alcançar meus objetivos, pois sem Ele nada é possível.

À minha mãe, Ligia, e meu irmão Alberto, pelo imenso amor que recebo deles, por sempre me apoiarem nos estudos, sendo sempre meus exemplos de conquista e superação de provações na vida.

Ao meu pai, Rafael (*In memoriam*), que tanto sonhou me ver formada e seguindo essa profissão, sempre me apoiando no que fosse necessário para me ver cada vez melhor, onde ele estiver, com certeza está muito feliz.

Ao meu namorado, Walter Vellasco, que sempre me deu suporte na pesquisa, sendo meu estagiário, meu psicólogo e também, muitas vezes, meu orientador, tudo isso para que eu não desistisse.

Aos meus familiares que estiveram torcendo por mim.

Aos estagiários do Laboratório de Entomologia Aplicada, Flávio Rodrigues, Camila Lima, Camila Serrão e André Athaide, que, na verdade, foram grandes amigos e parceiros, uma vez que foram voluntários durante todo o período e se dedicavam ao máximo, sempre oferecendo ajuda, qualquer dia e hora.

Aos colegas do Laboratório de Proteção de Plantas, Gleiciane Rodrigues, Fernando Souza, Alessandra Moraes, Ricardo Machado e Gledson Castro que caminharam comigo nessa jornada, sempre trocando ideias.

À equipe da empresa Agropalma: Ricardo Tinôco, Gilson Chia, Ana Carmem e toda a equipe do museu de entomologia, José Malta, Juarissandro Santos e Geoquinho Santos, pela concessão dos dados para análise, informações e apoio logístico, para o êxito deste trabalho.

A minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Telma Fátima Vieira Batista, pela confiança depositada em mim, paciência e apoio na pesquisa. Também a Prof<sup>a</sup>. Gisele Barata por ter me recebido de braços e coração aberto no dia que cheguei ao Laboratório de Proteção de Plantas.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Agronomia (PGAGRO), aos professores e funcionários, por estarem prontamente disponíveis durante todas as atividades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

As lagartas desfolhadoras de palma de óleo, *Automeris liberia* e *Brassolis sophorae* são consideradas pragas importantes na cultura, por causarem grandes desfolhamentos diminuindo a produção, em vários estágios de desenvolvimento da cultura. Objetivou-se descrever a biomorfometria das desfolhadoras *A. liberia* e *B. sophorae* e avaliar o biocontrole com os fungos *Isaria* sp., *Trichoderma* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, onde 239 isolados foram obtidos de solos de diferentes áreas de plantio de palma de óleo da empresa Agropalma S/A. Após screening toxicológico sobre larvas de 3º instar do besouro *Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae), foram selecionados nove isolados, sendo cinco da espécie *M. anisopliae* e quatro de *B. bassiana*, destes em testes de TL 50, foram selecionado os isolados UFRA\_Ma62 (*M. anisopliae*) e UFRA\_Bb05 (*B. bassiana*) na concentração  $10^8$  conídios. mL<sup>-1</sup>., os quais avaliados em campo sobre automeris. Os resultados das biológicas demonstraram que o ciclo biológico foi de 85 e 166 dias para *A. liberia* e *B. sophorae*, respectivamente. Apresentando dimorfismo sexual quanto ao tamanho do adulto e diferença de antenas entre machos e fêmeas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ), utilizando o programa R. Os testes de campo mostraram maior eficiência de controle quando utilizado o isolado UFRA\_Ma62 e menos custo do tratamento padrão com *B. thuringiensis*.

**Palavras-chave:** *Automeris liberia*; *Brassolis sophorae*; *Elaeis guineensis*.

## ABSTRACT

The oil palm leaf stripper caterpillars, *Automeris liberia* and *Brassolis sophorae* are considered important pests in the crop, because they cause large defoliation, reducing production at various stages of crop development. The objective of this study was to describe the biomorphometry of the leaf strippers *A. liberia* and *B. sophorae* and to evaluate the biocontrol with the fungi *Isaria* sp., *Trichoderma* sp., *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, where 239 isolates were obtained from soils from different areas of palm plantation of the company Agropalma S / A. After toxicological screening on third instar larvae of the *Tenebrio molitor* beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), nine isolates, five of *M. anisopliae* and four of *B. bassiana*, were selected and evaluated again on coleopteran larvae under different concentrations. The best performance of the isolates UFRA\_Ma62 (*M. anisopliae*) and UFRA\_Bb05 (*B. bassiana*) at concentration  $10^8$  conidia. mL<sup>-1</sup>, which were tested on caterpillars in the laboratory and in the field. Biological results showed that the biological cycle was 85 and 137 days for *A. liberia* and *B. sophorae*, respectively. Sexual dimorphism regarding adult size and antenna difference between males and females. Statistical analyzes were performed using the Newman-Keuls test ( $P < 0.05$ ) using the R program. Field tests showed greater control efficiency when using the UFRA\_Ma62 isolate and less cost than standard treatment with *B. thuringiensis*.

**Keywords:** *Automeris liberia*; *Brassolis sophorae*; *Elaeis guineensis*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	9
<b>CAPÍTULO 2. BIOLOGIA E MORFOMETRIA DE <i>Automeris liberia</i> CRAMER (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) EM PALMA DE ÓLEO NA AMAZÔNIA ORIENTAL</b> .....	14
<b>Resumo</b> .....	18
<b>Abstract</b> .....	19
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
Coleta .....	21
Criação em laboratório .....	22
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
Ovos .....	25
Lagartas .....	27
Pupa.....	29
Adultos .....	29
<b>CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>CAPÍTULO 3. BIOLOGIA E MORFOMETRIA DE <i>Brassolis sophorae</i> LINNEAUS (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) EM PALMA DE ÓLEO NA AMAZÔNIA ORIENTAL</b> .....	35
<b>Resumo</b> .....	39
<b>Abstract</b> .....	40
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	41
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
Coleta .....	42
Criação em laboratório.....	42
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
Ovo .....	44
Lagarta.....	45
Pupa.....	47
Adulto.....	49

<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>CAPÍTULO 4. SOBREVIVÊNCIA DE LAGARTAS DAS PALMEIRAS APÓS EXPOSIÇÃO A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOB DIETA NATURAL COM PALMA DE ÓLEO</b> .....	53
<b>Resumo</b> .....	57
<b>Abstract</b> .....	58
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	59
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	60
Lagartas .....	60
Aplicação e avaliação de mortalidade .....	60
Suspensão bacteriana.....	61
Fungos entomopatogênicos .....	61
Determinação da densidade e viabilidade dos esporos da suspensão fúngica .....	62
Análises estatísticas.....	63
<b>RESULTADOS</b> .....	63
Densidade e viabilidade de esporos de suspensão de fungos.....	63
Sobrevivência de lagartas <i>B. sophorae</i> após exposição a tratamentos a base de fungos entomopatogênicos.....	64
<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>CAPÍTULO 5. SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA MANEJO DE <i>Automeris liberia</i> (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) EM ÁREA COMERCIAL DE PALMA DE ÓLEO NA AMAZÔNIA ORIENTAL</b> .....	70
<b>Resumo</b> .....	75
<b>Abstract</b> .....	76
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	77
<b>METODOLOGIA</b> .....	78
Coleta dos isolados e <i>screening</i> toxicológico .....	78
Aplicação dos isolados em campo .....	79
Potencial econômico .....	80
Identificação molecular dos isolados .....	80
Análise estatística.....	82
<b>RESULTADOS</b> .....	82
Coleta e seleção dos isolados .....	82
Controle de <i>Automeris liberia</i> em campo .....	84
Identificação molecular dos isolados .....	85

Eficiência de controle.....	88
Potencial econômico .....	89
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>

## **CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO**

## CONTEXTUALIZAÇÃO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África, sendo encontrada em povoamentos subespontâneos desde o Senegal até a Angola. No Brasil adaptou-se bem ao clima tropical úmido de algumas regiões (TRINDADE et al., 2005). A cultura vem se destacando pelo aumento da demanda de biocombustíveis no mundo, o óleo dessa palma é considerado como a melhor alternativa para produção de biodiesel (AGRIANUAL, 2013) por possuir maior produtividade de óleo vegetal do mundo (MURPHY, 2007). O consumo mundial está na faixa dos 56.471 milhões de toneladas anuais e vem crescendo em aproximadamente dois milhões de toneladas anualmente (USDA, 2013).

Atualmente, o Estado do Pará é o maior produtor nacional de palma de óleo (SAGRI, 2013), responsável por 83,35% (IBGE, 2014). E nos últimos anos vem aumentando ainda mais a área plantada. A expansão dessa cultura trará muitos benefícios econômicos e sociais para a região. Entretanto, há um grande entrave para expansão da cultura em determinadas regiões do Estado, pois de acordo com Medeiros e Sano (1988) o cultivo da palma de óleo também está sujeito a surtos populacionais de pragas, se constituindo, muitas vezes, como fator limitante. Dentre as pragas, na América do Sul que mais causam danos econômicos a cultura, são as lagartas desfolhadoras, que comprometem a produtividade da palmeira principalmente na região Amazônica (RIBEIRO et al., 2010), destacam-se as espécies *Opsiphanes invirae* Hübner, 1818 e *Brassolis sophorae* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Nymphalidae), *Automeris illustris* Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae), por serem muito frequentes em plantios na região Norte do Brasil.

Como alternativa no controle dessas pragas, têm-se os fungos entomopatogênicos pertencentes à ordem Hypocreales por desempenharem papel importante no controle de insetos (INGLIS et al., 2001). Numerosos micoinseticidas tem sido desenvolvidos com base nesses fungos, particularmente com as espécies *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (COPPING, 2009).

Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (Bals.) Vuill. e *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. São mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de inúmeras pragas agrícolas. Essas espécies apresentam potencial de controle para diversas ordens de insetos (BRIDGE et al., 1990, ALVES, 1992, PEREIRA et al., 1993), inclusive para lepidópteros pragas, como *Plutella xylostella* (L.) (Vandenberg et al., 1998), *Alabama argillacea*

(Huebner) (César Filho, 2000) e *Diatraea saccharalis* Fabr. (Alves et al., 1984), como também do gênero *Castnia* que são suscetíveis a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, a exemplo da broca do talo do abacaxizeiro *Castnia icarus* (Cramer) (Silva e Veiga, 1998).

Em estudo de patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *Isaria farinosa* em *Brassolis sophorae*, Cunha et al. (2014) atestou maior eficiência no controle com *I. farinosa*, alcançando até  $94 \pm 2,45\%$  de mortalidade a concentração de  $10^8$  conídios/mL, enquanto que o controle com *M. anisopliae* chegou a  $42,5 \pm 5,26\%$  na mesma concentração.

Objetivou-se descrever a biomorfometria das desfolhadoras *A. liberia* e *B. sophorae* Em laboratório e avaliar o biocontrole com os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* nativos da *Ámazonia oriental* em populações naturais e em condições controladas.

## REFERÊNCIAS

**AGRIANUAL:** anuário da agricultura brasileira. São Paulo: agraFNP Consultoria e Agroinformativos, 2013.

ALVES, S.B.; RISCO, S.H.; SILVEIRA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* to *Diatraea saccharalis*. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie** 97: 403-406. 1984.

ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27: 77-86. 1992.

BRIDGE, P.D., ABRAHAM, Y.J., CORNISH, M.C.; PRIOR, C.; MOORE, D.; The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Mycology** 111: 85-90. 1990.

CÉSAR FILHO, E. Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para lagartas de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e o efeito de inseticidas sobre esses entomopatógenos. **Dissertação de mestrado**, UFRPE, Recife, 53p. 2000.

COPPING, L.G. **The manual of biocontrol agents: a world compendium**. 4 ed. Alton: British Crop Production Council, 2009. 336 p.

CUNHA, F.; DEPIERI, R.A.; MENEZES JR, A.O.; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T.M.; RAMOS, V.M.; LEITE, R.G.F.; ALMEIDA, V.T. 2014. Patogenicidade dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Isaria farinosa* em *Brassolis sophorae* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Científica** 42: 2. 143–146. 2014.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CAB International, 2001. P. 23-69.

MEDEIROS, J. S.; SANO, E. Análise multitemporal de imagens digitais do Landsat TM na detecção de áreas afetadas por ataques de lagartas *Sibine fusca* na cultura de dendê (*Elais guineensis*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO., 5, Natal, (RN) , 1988. **Anais...**São José dos Campos, INPE, 1988.

MURPHY D. J. Future prospects for oil palm in the 21st century: biological and related challenges. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 296-306, 2007.

PEREIRA, R.M., STIMAC, J.L.; ALVES, S.B. Soil antagonism affecting the dose-response of workers of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology** 61: 156-161. 1993.

RIBEIRO, R. C.; LEMOS, W. P.; BERNARDINO, A. S.; BUECKE, J.; MÜLLER, A. A. Primeira ocorrência de *Alcaeorrhynchus grandis* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) predando lagartas desfolhadoras do dendezeiro no Estado do Pará. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 131-132, 2010.

SILVA, R.B.Q.; VEIGA, A.F.S.L. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre *Castnia icarus* (Cramer, 1775). **Revista Agrícola** 73: 119-127. 1998.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; FURLAN, J. Abordagem sobre o estado atual das pesquisas para a identificação do agente causal do amarelecimento fatal do dendezeiro. In: POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D.R.; SANTOS, I.P. **Pragas e Doenças de cultivos amazônicos**. (Ed.). Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 439-450p.

USDA – United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Biocombustíveis - Oil seeds: World markets and Trade. December, 2014. 1-34p. **Circular series**. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov>>. Acesso em: 08 de set. 2015.

VANDENBERG, J.D.; SHELTON, A.M.; WILSEY, W.T.; RAMOS, M. Assesment of *Beauveria bassiana* sprays for control the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on crucifers. **Journal of Economic Entomology** 91: 624-630. 1998.

**CAPÍTULO 2. BIOLOGIA E MORFOMETRIA DE *Automeris liberia* CRAMER  
(LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) EM PALMA DE ÓLEO NA AMAZÔNIA  
ORIENTAL**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>CC</b>	Comprimento do corpo
<b>ØT</b>	Diâmetro do tórax
<b>E</b>	Envergadura
<b>CAA</b>	Comprimento da asa anterior
<b>AAA</b>	Altura da asa anterior
<b>CAP</b>	Comprimento da asa posterior
<b>AAP</b>	Altura da asa posterior
<b>TA</b>	Tamanho da antena
<b>NA</b>	Número de antenômeros
<b>M</b>	Massa

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização geográfica (2° 31'33.9"S e 48°45'49.1" W) das áreas de coleta de lagartas de *Automeris liberia* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE). Amazônia Oriental, Brasil..
- Figura 2.** Ciclo de vida de *Automeris liberia* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil. Postura gregária (A); Ovo individualizado (B); Cápsula cefálica (C); Lagarta no primeiro instar (D); Lagarta no sétimo instar (E); Pupas. À esquerda, fêmeas e à direita, macho (F); Desenho esquemático mostrando o dimorfismo entre as pupas (G); indivíduos adultos. Macho, vista dorsal (H); macho, vista ventral (I); fêmea, vista dorsal (J); fêmea, vista ventral (K). Barra = 1mm.
- Figura 3.** Parâmetros morfométricos do adulto de *Automeris liberia*. Comprimento do corpo (CC), diâmetro do tórax ( $\emptyset T$ ), envergadura (E), comprimento da asa anterior (CAA), altura da asa anterior (HAA), comprimento da asa posterior (CAP), altura da asa posterior (HAP), comprimento da antena (CA), número de antenômeros (NA) e massa corpórea em gramas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre médias (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ), as barras representam o desvio padrão entre as médias,  $n=10$ . \*Os valores reais de massa foram multiplicados por 5, para facilitar a visualização na escala gráfica.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Duração (dias) do ciclo biológico de *Automeris liberia* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE), alimentados com dieta natural a base de folhas de palma de óleo, variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil.
- Tabela 2** Medidas de ovos de *Automeris liberia* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo, variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil..
- Tabela 3** Tempo, comprimento, largura, massa e largura de cápsulas cefálicas de ínstaes larvais de *Automeris liberia* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil.

## **Biologia e morfometria de *Automeris liberia* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) em palma de óleo na Amazônia Oriental**

### **Resumo**

A espécie *Automeris liberia* Cramer tem ocorrência na América do Sul, com registro no Equador, Peru, algumas regiões no México e, mais recentemente, na Amazônia brasileira, causando danos a várias espécies de plantas. O presente estudo mostra a incidência desta lagarta causando desfolhamento em plantas de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq), na região Amazônica, Estado do Pará e fornece informações sobre a biologia e morfologia do inseto nesta região. A alimentação dos insetos, foi natural a base de folhas de palma de óleo, variedade Tenera. O estágio do ovo durou, em média, 14,06 dias. O estágio larval teve sete ínstaes, com duração média de 35,58 dias. O estágio de pupa durou 21,45 dias, é nesta fase já foi possível a diferenciação sexual. O adulto teve longevidade de 4,5 e 5,83 dias para macho e fêmea, respectivamente. O ciclo biológico total foi de 78,5 e 80 dias para machos e fêmeas, respectivamente. A razão média de crescimento da cápsula encefálica foi de 1,49. As antenas dentro da espécie apresentam um dimorfismo sexual, sendo a antena do macho bipectinada e da fêmea filiforme. Na fase adulta foram avaliadas variáveis morfológicas entre machos e fêmeas, as quais apresentaram diferença estatística pelo teste Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** *Elaeis guineenses* Jacq; lagarta desfolhadora; mariposa

## **Biology and morphometry of *Automeris liberia* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) in oil palm in the Amazon**

### **Abstract**

The species *Automeris liberia* Cramer occurs in South America, registered in Ecuador, Peru, some regions in Mexico and, more recently, in the Brazilian Amazon, causing damage to several species of plants. The present study shows the incidence of this caterpillar causing defoliation in oil palm plants (*Elaeis guineensis* Jacq), in the Amazon region, State of Pará, and provides information on the biology and morphology of the insect in this region. Insect feeding was natural based on oil palm leaves, variety Tenera. The egg stage lasted, on average, 14.06 days. The larval stage had seven instars, with an average duration of 35.58 days. The pupa stage lasted 21.45 days, and at this stage sexual differentiation was already possible. The adult must longevity of 4.5 and 5.83 days for male and female, respectively. The total biological cycle was 78.5 and 80 days for males and females, respectively. The average growth rate of the head capsule was 1.49. The antennae within the species have a sexual dimorphism, the antenna of the male being bipectinated and the female filiform. In adulthood, morphological variables between males and females were evaluated, which showed statistical difference by the Newman-Keuls test ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** *Elaeis guineenses* Jacq; leaf stripper caterpillar; moth

## INTRODUÇÃO

Borboletas e mariposas são considerados indivíduos importantes em ecossistemas tropicais, uma vez que interagem com a vegetação e fauna local (Basset et al., 2017; Goldstein, 2017; Johnson et al., 2017; Mitter et al., 2017), porém podem ocasionar danos a algumas espécies de plantas hospedeiras, uma vez que mais da metade das espécies de interesse agrônômico são polípagas (Formentini et al., 2015).

Popularmente conhecida como “mariposa alvo”, a espécie *Automeris liberia* Cramer é composta de mariposas da família Saturniidae, subfamília Hemileucinae. De acordo com (Specht et al., 2006), o gênero *Automeris* tem 135 espécies, que podem variar em tamanho. São caracterizadas por uma grande mancha preta ou vermelha arredondada que se assemelha a um olho na asa posterior. Outra característica é o erucismo causado por suas lagartas, quando em contato com a pele humana, pode causar queimaduras graves. É uma lagarta desfolhadora, com ocorrência em vários países, na América do Sul, no Equador e Peru e algumas regiões no México, Trinidad e Tobago (Cock, 2005). Em levantamentos realizados, lagartas do gênero *Automeris* foram encontradas causando danos em uma série de espécies vegetais, como: banana, abacate, algodoeiro, cafeeiro, eucalipto, mangueira, citrus etc. nas regiões sul e sudeste do Brasil, e até no nordeste brasileiro estado de Alagoas, Ceará e Maranhão (Zanúncio et al., 1992), sendo registrado neste último o ataque a plantas de eucalipto (Specht et al., 2006, 2007). Em pesquisa realizada no estado do Paraná, Santos et al. (2015), também foram encontrados indivíduos deste gênero nos municípios de Vossoroca e Tijucas do Sul.

Em levantamento realizado, nenhum registro mostrou a ocorrência dessa espécie causando danos em plantas da família Areacaceae, no entanto, recentemente (Silva et al., 2019), relata a presença de *Automeris liberia* na Amazônia, mais precisamente estado Pará (município de Tailândia), atacando plantas de palma de óleo.

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma espécie da família arecaceae de origem africana, cultivada em regiões tropicais úmidas da África, Ásia e América, e, segundo Wahid et al. (2004), representa a mais importante fonte de óleo vegetal para o consumo humano. May (2012) mostrou que mais de 80% é destinada para indústria de alimentos e, segundo Brandão & Schoneveld (2015), o estado do Pará apresenta uma área plantada com palma de óleo de aproximadamente 250.000 ha, desse total, o Pará responde por 86,44% da produção nacional de palma de óleo.

Os plantios no estado do Pará região norte do Brasil já começam a apresentar incidência da espécie, sendo este o segundo registro de ocorrência deste inseto causando danos em palma de óleo na sua forma larval, as quais se alimentam de folhas, causando, portanto, desfolhamento da planta, implicando na diminuição da área foliar, o que vai refletir na diminuição da produção de foto assimilados e conseqüentemente ocasionando a diminuição da produção de óleo.

Pesquisas sobre ocorrência de mariposas da família Saturniidae, mostrando a presença do gênero *Automeris* são frequentes, porém pouco se sabe sobre a biologia das mesmas (Albertone & Duarte, 2015; Pérez et al., 2017; Albertone et al., 2018; Baz et al., 2018). Assim, por ser uma praga de recente ocorrência na região (norte do Brasil), a disponibilidade de informações sobre esta espécie causando danos em palmeiras são incipientes. Diante do exposto, o referido trabalho visa estudar a biologia e a morfologia da praga, em laboratório sob dieta natural, com folhas de palma de óleo, visando com isso subsidiar informações para ações de manejo que visem minimizar os danos causados para cultura da palma de óleo, no estado do Pará.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta

Inicialmente, foram coletados indivíduos da lagarta *Automeris liberia* no campo, em plantas de palma de óleo, em área comercial, a qual se localiza nos municípios de Tailândia, Moju, Acará e Tomé-Acú, nordeste do Pará, sob coordenadas 2° 31'33.9 "S 48° 45'49.1" W (Figura 1).

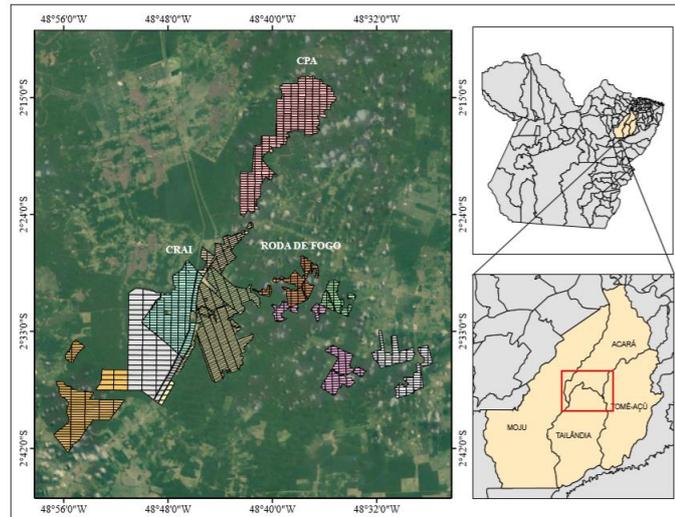


Figura 1. Localização geográfica ( $2^{\circ} 31'33.9''\text{S}$  e  $48^{\circ}45'49.1''\text{W}$ ) das áreas de coleta de lagartas de *Automeris illustris* (Lepidoptera: saturniidae). Amazônia Oriental, Brasil

### Criação em laboratório

Após a coleta, as lagartas foram levadas para o Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA) localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA, sob coordenadas  $1^{\circ} 45' 59.82''\text{S}$   $48^{\circ} 43' 77.16''\text{W}$ . Inicialmente, foram acondicionadas individualmente em potes plásticos, translúcidos, de material polipropileno, com capacidade de 500 mL, coberto por tecido do tipo voal e preso por liga plástica em ambiente com temperatura de  $\pm 26^{\circ}\text{C}$ , com troca de alimentação natural a base de folhas de palma de óleo da variedade Tenera, diariamente.

Para maior durabilidade, as folhas foram acondicionadas em refrigerador a  $20^{\circ}\text{C}$ . A cada troca de alimentação as folhas receberam um tufo de algodão umedecido com água destilada na base dos folíolos para manter a turgescência.

As medidas e a descrição dos estágios do inseto foram realizadas a partir do momento em que iniciaram a fase de pupa, uma vez que seria possível colocá-las em uma escala de igualdade temporal. Nesta fase foram avaliados comprimento, largura e massa da pupa, assim como sua identificação sexual.

Posteriormente, as mariposas foram avaliadas morfometricamente e biologicamente, sendo avaliados os parâmetros de comprimento do corpo (CC), diâmetro do tórax ( $\emptyset\text{T}$ ), envergadura (E), comprimento da asa anterior (CAA), altura da asa anterior (HAA), comprimento da asa

posterior (CAP), altura da asa posterior (HAP), comprimento da antena (CA), número de antenômeros (NA) e massa corpórea, assim como seu comportamento e longevidade.

A fase imatura foi dividida em dois métodos de criação. No primeiro, as lagartas foram individualizadas desde a eclosão, totalizando 100 indivíduos, passando assim pelas análises morfológicas e biométricas, as quais determinaram suas características de coloração, erucismo, comprimento, largura, massa e o tempo em cada ínstar.

As cápsulas cefálicas foram medidas com auxílio de microscópio estéreo Olympus com câmera acoplada. Usando o software Toupview (x86). A análise biométrica foi feita de acordo com Parra & Haddad (1989) e o crescimento baseado no modelo linear de Dyar (1890) foi avaliado.

No segundo grupo, as lagartas foram separadas a cada 20 indivíduos de forma gregária, uma vez que a intenção era apenas a manutenção da criação.

Ambos foram alimentados com folhas de palma de óleo da empresa Agropalma S/A, plantio da variedade Tenera, uma vez que se observa a preferência da espécie por folhas desta variedade, uma vez que há pouca ocorrência da lagarta na área de plantio com híbrido interespecífico. A alimentação foi trocada diariamente, e um tufo de algodão umedecido foi colocado na base do folíolo para manter a turgescência das folhas.

As lagartas individualizadas foram mantidas em recipientes de polipropileno, redondos, translúcidos, com volume de 500 mL, cobertos com tecido branco Voal, lacrados com ligas elásticas. As lagartas criadas em grupo foram acondicionadas em recipientes translúcidos de polipropileno, com dimensões de 21,5 x 12 x 35 cm, para largura, altura e profundidade, respectivamente, com volume de 5 litros, também cobertas com tecido voal e seladas com liga elástica.

Período pré-pupa, no qual as lagartas param de alimentar-se e apresentaram um comportamento mais retraído, cessando suas atividades, em busca de um local para mudar para o estágio de pupa, as folhas foram removidas e colocados apenas tufos de algodão umedecido no fundo do recipiente, para manter a umidade necessária. Após a formação do casulo, foi feito um corte para a verificação real da formação de pupas.

Posteriormente, quando a cutícula já estava mais rígida, as pupas foram retiradas do envoltório para avaliação de massa, maior largura e comprimento, bem como a verificação do

sexo (Butt & Cantu, 1962). Também se calculou a razão sexual conforme a Eq. 1 (Posso et al., 1989):

$$(1) \quad RS = \frac{\text{número de fêmeas}}{(\text{número de machos} + \text{número de fêmeas})}$$

Adulto, as mariposas foram alojadas em duas categorias de gaiolas, que diferiam, principalmente em relação ao tamanho, dependendo do objetivo. A primeira gaiola, maior, com dimensões de 2,15 x 1,85 x 3,80 metros, para largura, altura e profundidade, respectivamente. Os lados e teto estavam cobertos com tecido voal. Três mudas de palma de óleo foram colocadas em seu interior, para que as mariposas encontrassem um ambiente mais propício para a reprodução e oviposição.

As outras gaiolas apresentaram dimensões menores que a primeira, 0,40 x 0,40 x 0,40 m, para largura, altura e profundidade, respectivamente, foram utilizadas para estudar individualmente o comportamento de adultos machos e fêmeas. Número de ovos por postura e comportamento de acasalamento foram avaliados, assim como o tempo de vida.

Na fase de ovo, as posturas foram coletadas das gaiolas e colocadas em placas de petri de dimensões 150 x 20 mm, com papel de filtro levemente umedecido diariamente e mantido em B.O.D. a temperatura  $26 \pm 1$  °C, umidade 70% e fotofase 12 h. Medidas de comprimento, largura inferior, superior, massa, bem como sua caracterização de coloração foram realizadas. O número de ovos por postura também foi contado, uma vez que é gregário.

Para avaliar possíveis diferenças morfométricas entre machos e fêmeas, os dados foram submetidos ao teste de média Neuwman – Keuls ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A duração do ciclo completo de *Automeris liberia* no laboratório foi de 75,33 e 76,92 dias para machos e fêmeas, respectivamente (Tabela 1). Sendo três dias para o período pré-pupal.

Dados da Tabela 1, mostram que o estado de pupa de *Automeris liberia* não difere estatisticamente entre machos e fêmeas significativamente ( $P < 0,05$ ), enquanto que da fase adulta as fêmeas são superiores aos machos diferindo estatisticamente dos machos, estes resultados diferem dos resultados encontrados encontrados por Specht (2006), trabalhando com lagartas da espécie *Automeris illustris* no Rio Grande do Sul, tendo tido um menor

período para pupa 19,17 dias e superior para o adulto 7,83 dias. Quando se compara os resultados encontrados por Specht (2007) trabalhando com *Automeris naranja*, no Rio Grande do Sul, também diferem dos resultados aqui encontrados, sendo que desta vez tanto os dias da fase de pupa como da fase de adulto são expressivamente maiores, essas diferenças podem estar associadas as variações climáticas, genéticas e alimentares das populações trabalhadas.

Tabela 1. Duração (dias) do ciclo biológico de *Automeris liberia* (Lepidoptera: saturniidae), alimentados com dieta natural a base de folhas de palma de óleo, variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil

Estágio	Tempo (dias)
Ovo	14 ± 0,02
Lagarta	35,58 ± 0,23
Pupa (macho)	21,19 ± 0,2 A
Pupa (fêmea)	21,45 ± 0,24 A
Adulto (macho)	4,5 ± 0,19 b
Adulto (fêmea)	5,83 ± 0,21 a

Letras maiúsculas comparam pupa macho e fêmea, letras minúsculas comparam adulto macho e fêmea, e as letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre médias (Newman & Keuls, P<0,05)

## Ovos

São encontrados presos a substratos, como folhas e tecido (voal) pela extremidade mais estreita. As posturas são de forma gregária, com  $24 \pm 0,02$  em cada uma, são unidos pela aderência no substrato e também levemente pelas suas laterais (Figura 2A). A postura de ovo gregário apresentada pela espécie se assemelha àquela observada em outras espécies do gênero (Lemaire, 2002) e principalmente com ovos de *Automeris naranja* (Specht *et al.*, 2007) e *A. illustris* (Specht *et al.*, 2006), bem como a aparência. Porém quanto a fixação dos ovos, se diferencia das oviposições das mariposas *A. illustris*, as quais somente estão presos pelo substrato, já se assemelhando a *A. naranja*.

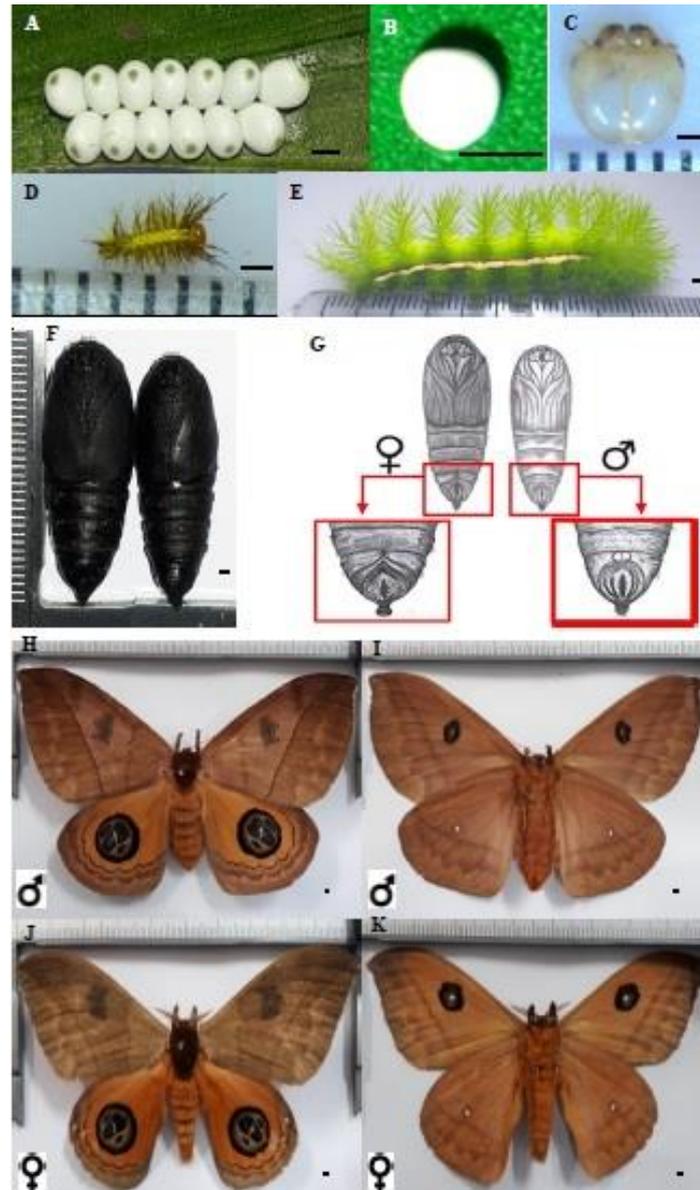


Figura 2. Ciclo de vida de *Automeris liberia*. Postura gregária (A); Ovo individualizado (B); Cápsula cefálica (C); Lagarta no primeiro ínstar (D); Lagarta no sétimo ínstar (E); Pupas. À esquerda, fêmeas e à direita, macho (F); Desenho esquemático mostrando o dimorfismo entre as pupas (G); indivíduos adultos. Macho, vista dorsal (H); macho, vista ventral (I); fêmea, vista dorsal (J); fêmea, vista ventral (K). Barra = 1mm

Possuem forma trapezoidal, ligeiramente achatada lateralmente e no final da micrópila, assemelhando-se a um coração. Apresenta uma cor branca com uma micrópila verde-clara, que se torna enegrecida no centro próximo à eclosão das larvas, mas mantendo um anel verde ao seu redor (Figura 2B). O diâmetro central, superior, inferior e altura aferido foram  $1,68 \pm 0,02$ ;  $1,35 \pm 0,02$ ;  $1,13 \pm 0,02$  e  $1,89 \pm 0,02$  mm, respectivamente. Quanto ao tempo de incubação, assemelha-se ao tempo da espécie *Lanomia obliqua*, a qual apresentou período de incubação de 17 dias quando estudada por Lorini (1999).

A viabilidade destes ovos foi de  $63,56 \pm 0,62\%$ . Houve diferença entre ovos fecundados em laboratório e ovos fecundados em campo, mas não houve diferença entre a fertilidade dos ovos das gaiolas com pares individualizados e gaiola com maior número de indivíduos. O tempo entre postura e eclosão foi de 14 dias (Tabela 1).

Tabela 2. Medidas de ovos de *Automeris liberia* (Lepidoptera: saturniidae), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo, variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil

<b>Parâmetros</b>	<b>Dimensão</b>
<b>Diâmetro Central (mm)</b>	1,68 $\pm$ 0,02
<b>Diâmetro Superior (mm)</b>	1,35 $\pm$ 0,02
<b>Diâmetro Inferior (mm)</b>	1,13 $\pm$ 0,02
<b>Altura (mm)</b>	1,89 $\pm$ 0,02

## **Lagartas**

Nas primeiras 48 horas após a eclosão, as lagartas não consomem as folhas oferecidas. Somente após esse período começam a comer os folíolos oferecidos, provavelmente se deve à alimentação apenas do córion remanescente de ovos no início da vida (Lemaire, 2002), que é característico de indivíduos da subfamília Hemileucinae e esse consumo inicia sempre pelas bordas e, preferencialmente, pela parte abaxial. Logo em seguida, ocorre a primeira ecdise, caracterizando o fim do primeiro ínstar (Figura 2D).

No segundo ínstar, assim como no primeiro, as lagartas apresentam coloração amarelo esverdeado, suas cerdas apresentam extremidades marrons. Nesse período, eles exibem um comportamento gregário, mas não há obrigação de estar juntos para sua sobrevivência. Suas cerdas ainda não apresentam ação urticante quando em contato com a pele, mantendo-se deste modo até o quinto ínstar. As pernas apresentam colchetes na cor preta, coberto por cerdas brancas, como se fossem pequenas botas, estas estruturas ajudam na locomoção das mesmas e são características da ordem lepidóptera.

No segundo ínstar, as lagartas são verde-claras, mas as extremidades das cerdas já não são mais escuras. No terceiro ínstar a coloração se torna verde intenso, que dura até o estágio pré-pupal.

Quando no quinto ínstar a lagarta começa a apresentar o erucismo, característica que se intensifica com o passar do tempo até a fase de pupa. Concomitantemente, a aparência de uma faixa longitudinal aparece em ambos os lados do corpo da larva.

O sexto ínstar se distingue pela aparência de uma linha longitudinal, agora vermelha, na borda superior da linha branca já presente. E, finalmente, no sétimo ínstar a aparência de outra linha vermelha aparece, mas na borda inferior da linha branca (Figura 2E).

Ao final do ciclo, observa-se a alimentação de lagartas, característica da fase pré-pupal, na qual o indivíduo também escolhe um local para descansar. Neste momento, o mesmo, começa a fazer seu casulo, com fios de seda na cor âmbar unindo folhas, neste caso também o tecido de voal.

As cápsulas cefálicas apresentam coloração verde ao longo do ciclo larval, o corpo está ganhando uma tonalidade mais forte de verde quando avança nos ínstaes. Tem cerdas com características urticantes, que se ramificam nas pontas, assemelhando-se a pequenas árvores de natal.

Os parâmetros morfométricos dessa fase estão na Tabela 3. Como confirmação da troca ínstaes, as cápsulas encefálicas foram coletadas e sua largura verificada (Figura 2C).

Tabela 3. Comprimento, largura e massa de ínstaes larvais de *Automeris liberia* (Lepidoptera: saturniidae), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil

	Lagarta			Cápsula cefálica	
	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Massa (g)	Largura (mm)	Razão de crescimento
<b>1º ínstar</b>	4,72 ± 0,38 A	0,71 ± 0,02 A	-	0.63 ± 0.05 A	-
<b>2º ínstar</b>	5,64 ± 0,45 A	1,36 ± 0,04 AB	0,01 ± 0,00	0.92 ± 0.08 AB	1,46
<b>3º ínstar</b>	7,06 ± 0,52 A	2,02 ± 0,05 B	0,02 ± 0,00	1.66 ± 0.01 B	1,8
<b>4º ínstar</b>	13,61 ± 1,41 B	2,83 ± 0,20 C	0,05 ± 0,00	2.35 ± 0.01 C	1,41
<b>5º ínstar</b>	21,56 ± 1,69 C	5,32 ± 0,26 D	0,20 ± 0,03 A	3.44 ± 0.01 D	1,46
<b>6º ínstar</b>	32,36 ± 4,0 D	7,18 ± 0,24 E	0,55 ± 0,06 B	4.97 ± 0.08 E	1,44
<b>7º ínstar</b>	50,21 ± 1,36 E	9,05 ± 0,59 F	1,97 ± 0,16 C	6.91 ± 0,02 F	1,39

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas entre médias (Newman-Keuls  $P < 0,05$ )

Os resultados na tabela 2, mostram que não houve diferenças estatísticas significativas de comprimento a 0,05 nos ínstaes 1º, 2º e 3º, já nos demais ínstaes 4º até o 7º o incremento do comprimento foi bem mais expressivo diferindo estatisticamente entre eles a ( $P < 0,05$ ), para as demais variáveis avaliadas, o quadro é semelhante ou seja os últimos ínstaes vão apresentar diferenças estatísticas semelhantes entre eles.

Em resultados apresentados por Specht (2007), embora não tenha aplicado um teste estatístico para contrastes entre os valores encontrados para largura da capsula cefálica, aplicando apenas o erro padrão para avaliar diferenças, percebe-se que os resultados são idênticos ou seja são diferentes nos últimos quatro ínstaes. Também vale ressaltar a que o valor da razão da capsula cefálica de 1,49 vezes a cada ínstar, concorda com o resultado encontrado por Gonçalves et al. (2020), mostrando a relação de crescimento na mesma família.

### **Pupa**

No início desta fase as pupas apresentavam coloração verde, mas depois de algumas horas escureceram, tornando-se pretas (Figura 2F). São do tipo obteca e apresentam pequenas cerdas na cor âmbar em todo o comprimento do corpo. As fêmeas apresentaram medidas maiores,  $2,75 \pm 0,04$  cm de comprimento,  $1,07 \pm 0,05$  cm de diâmetro torácico e  $2,21 \pm 0,12$  g de massa, enquanto os machos tiveram  $2,51 \pm 0,03$  cm de comprimento,  $1,02 \pm 0,01$  cm de diâmetro do tórax e massa de  $1,51 \pm 0,06$  g. Quanto à duração dessa fase, não houve diferença estatística, durando  $21 \pm 0,2$  e  $21,45 \pm 0,24$  dias para machos e fêmeas, respectivamente.

Durante a fase de pupa, a ocorrência do fenômeno da diapausa pode ser observada em alguns indivíduos, pois demoraram mais para emergir, aproximadamente 20 dias após os demais. Tal atraso pode ter ocorrido devido a um desequilíbrio de temperatura ocorrido no laboratório, quando faltavam poucos indivíduos a emergirem. Esta situação é muito comum ocorrer em outras espécies deste gênero (Lemaire, 2002), inferindo assim que a temperatura da área de incidência da mesma pode influenciar o número de gerações por ano, sendo inversamente proporcional.

O índice de sobrevivência foi de  $82,03 \pm 0,06$  %, enquanto a razão sexual foi de 0,55.

Houve diferenças sexuais nos últimos segmentos abdominais. O oitavo segmento da pupa feminina é dividido pelo nono segmento, causando a abertura da bolsa copuladora neste segmento. No macho, o 8º segmento não tem divisão, mas o 9º segmento tem 2 almofadas redondas em cada lado da linha ventral. (Figura 2G).

### **Adultos**

Nesta fase, as espécies continuaram a apresentar dimorfismo sexual por tamanho, sendo as fêmeas maiores que os machos, os quais apresentam coloração mais intensa. As antenas

também foram diferenciadas, nas fêmeas as antenas são filiformes e nos machos elas são bipectinadas. A longevidade não diferiu muito entre machos e fêmeas, 4,5 e 5,83 dias, respectivamente. A duração da fase adulta foi menor que a obtida por (Specht et al., 2006) alimentando-as com folhas de *Erythrina crista-galli* que tiveram um tempo de vida de 7,83 dias em adultos.

Observou-se a ocorrência da emergência no período entre 16 e 22 horas, tendo sido encontrado resultado semelhante ao período obtido na criação de *Automeris aurantica* por D'Almeida (1944), e pode ser indicativo de uma característica do gênero. Não foi possível identificar com certeza o período de acasalamento entre os indivíduos, uma vez que os mesmos apresentaram quase sempre comportamento agitado, porém no período do crepúsculo a movimentação era maior nas gaiolas, o que indica que, provavelmente, nesse momento era provável a ocorrência de cópula.

Quanto a morfometria, as fêmeas apresentaram-se maiores em tamanho, o que geralmente ocorre em lepidópteras (Albertoni et al., 2018), somente o número de antenômeros não apresentou diferença significativa.

As asas possuem coloração bege escuro, com o dorso apresentando faixa transversal na asa anterior, saindo da margem anal até o ápice e faixa em zig-zag próximo ao frênulo. Tanto fêmeas quanto machos possuem mácula escura irregular entre as duas faixas (Figuras 2H, J). As asas posteriores possuem coloração alaranjada, diferenciando-se nas bordas com uma faixa marrom ondulada, separando da coloração bege na borda anal da asa. Ainda nas asas posteriores, a fêmea apresenta um ocelo imitando um grande olho falso de branco e preto, e o macho mostra um olho falso menor e menos redondo. Característica conhecida como mimetismo batesiano, quando um organismo inofensivo exibe características de um organismo prejudicial.

Na observação ventral da mariposa, macho e fêmea também apresentam coloração bege. As asas anteriores dos machos possuem máculas circulares, com bordas marrom escuro, e marrom claro no interior, com um ponto branco no centro, o mesmo acontece para fêmeas, porém com dimensão menor. Ambos também apresentam duas faixas transversais, uma em zig-zag e outra reta, no sentido anal ao ápice da asa (Figura 2I, K).

Na asa posterior, visão ventral, também estão presentes duas faixas, nas mesmas características das asas anteriores, porém agora somente com um ponto branco próximo as mesmas.

O abdome do macho possui coloração alaranjada intenso no dorso e ventre, com largura menor que na fêmea e último segmento truncado. A cabeça e tórax possuem coloração marrom escura no dorso enquanto na parte ventral segue a mesma coloração do abdome.

A fêmea tem seu abdome mais largo e coloração dorsal alaranjado menos intenso, já na face ventral tem a bege seguindo pelo tórax e cabeça, os quais na face dorsal apresentam coloração marrom claro. O último seguimento do abdome apresenta terminação pontiaguda, pela presença do acúleo para a oviposição.

Os parâmetros morfométricos apresentaram dimorfismo sexual, obtendo a fêmea maiores medidas, como comprimento do corpo, 29,05 e 34,92 mm, diâmetro do tórax, 6,47 e 9,59 mm, envergadura, 79,5 e 9,59 mm, comprimento da asa anterior, 41,66 e 44,51 mm, altura da asa anterior, 26,88 e 33,23 mm, comprimento da asa posterior, 31,56 e 36,25 mm, altura da asa posterior, 19,50 e 26,98 mm, tamanho da antena, 7,52 e 5,75 mm, número de antenômeros, 30,70 e 30,80 e massa 0,36 e 1,08 g, para machos e fêmeas, respectivamente. Somente número de antenômeros não apresentou diferença entre os gêneros (Figura 3).

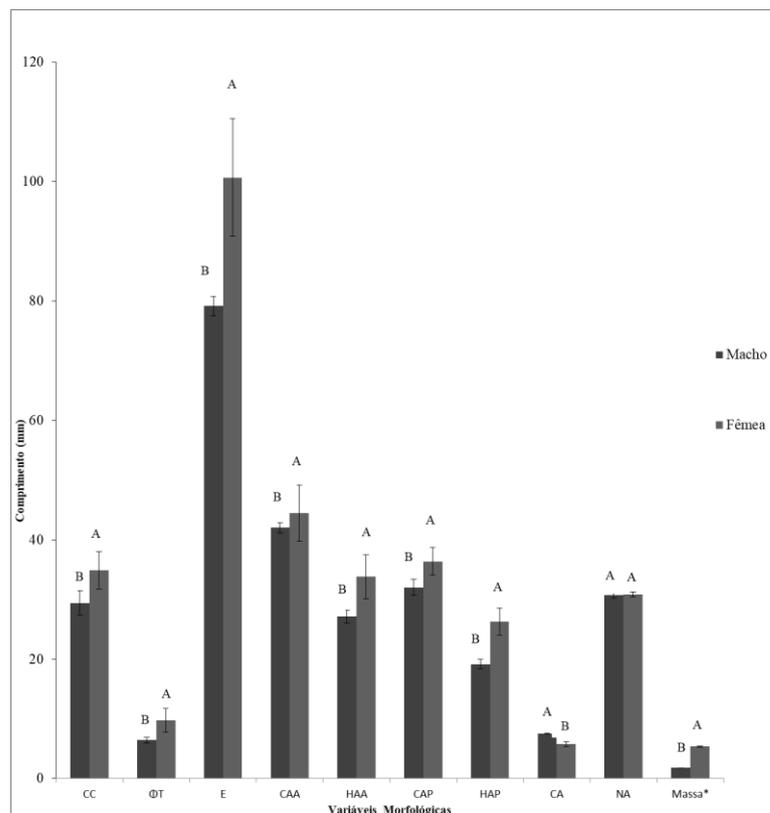


Figura 3. Parâmetros morfométricos do adulto de *Automeris liberia*. Comprimento do corpo (CC), diâmetro do tórax (ØT), envergadura (E), comprimento da asa anterior (CAA), altura da asa anterior (HAA), comprimento da asa posterior (CAP), altura da asa posterior (HAP), comprimento da antena (CA), número de antenômeros (NA) e massa corpórea em gramas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre médias (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ), as barras representam o desvio padrão entre as médias,  $n=10$ . \*Os valores reais de massa foram multiplicados por 5, para facilitar a visualização na escala gráfica

## CONCLUSÃO

O conhecimento gerado sobre a biologia e morfologia de *Automeris liberia* Cramer, na Amazônia geram subsídios importantes para ações de controle do inseto, servem de base para criação do inseto em laboratório, tornou possível a distinção sexual entre machos e fêmeas na fase de pupa, o que ainda não havia registros, bem como, confirma a presença do inseto causando danos em plantas de palma de óleo na Amazônia.

## AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedeu ao primeiro autor a escola de mestrado. Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, pelo apoio intelectual e orientação. A empresa Agropalma S/A, pela permissão de pesquisa, apoio logístico e financeiro.

## LITERATURA CITADA

Albertoni, F.F.; Duarte, M. 2015. Immature stages of *Adeloneivaia fallax* (Lepidoptera: Saturniidae). Florida Entomologist, v. 98, p.178-185, 2015. <https://doi.org/10.1653/024.098.0131>

Albertoni, F.F.; Mielke, C.G.C.; Duarte, M. Saturniid moths (Lepidoptera: Bombycoidea) from an Atlantic Rain Forest fragment in southeastern Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 90, n. 3, p.1-18, 2018. <https://doi.org/10.1590/00013765201820170629>

Basset, Y.; Lamarre, G.P.A.; Ratz, T.; Segar, S.T.; Decaens, T.; Rougerie, R.; Miller, S. E.; Perez, F.; Bobadilla, R.; Lopez, Y.; Ramirez, J.A.; Aiello, A.; Barrios, H. The Saturniidae of Barro Colorado Island, Panama: a model taxon for studying the long-term effects of climate change? Ecology and Evolution, v.7, p.9991–10004, 2017. <https://doi.org/10.1002/ece3.3515>

Baz, F.H.; González, J.M.; Camargo, M.C.N.; Sánchez, A.E.N.; Bobadilla, G.C. *Macadamia integrifolia* Maiden and Betche (Proteaceae), a New Host Plant Record for *Automeris zozine* (Druce 1886) from a Cloud Forest at Veracruz State, Mexico. Southwestern Entomologist, v.43, n.2, p.535-538, 2018. <https://doi.org/10.3958/059.043.0226>

Brandão, F.; Schoneveld, G. The state of oil palm development in the Brazilian Amazon: Trends, value chain dynamics, and business models. Bogor, Indonesia: Center for international Forestry Research. <http://dx.doi.org/10.17528/cifor/005861>. 2015.

Butt, B.A.; Cantu, E. Sex determination lepidopterous pupae. Washington: USDA. 1962. 7p. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.67261>.

Cock, M.J.W. *Automeris liberia* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) in Trinidad. Living World: Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club, 2005, p. 48-49.

Da Silva, K.B.; da Silva, C.B.; Ribeiro Junior, K.A.L.; de Freitas, J.M.D.; de Freitas, J.D.; Sanchez Chia, G.S.; Tinoco, R.S.; da Costa, J.G.; Goulart, H.F.; Santana, A.E.G. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae). Micron, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102682>.

Dyar, H.G. The number of molts of lepidopterous larvae. Psyche, v. 5, p.420-422, 1890. <http://dx.doi.org/10.1155/1890/23871>.

Formentini, A.C.; Gómez, D.R.S.; Moraes, S.V.P.; Barros, N.M.; Specht, A. Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay. Ciência Rural, v. 45, n. 12, p. 2113-2120, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141258>

Goldstein, P.Z. Diversity and significance of Lepidoptera: a phylogenetic perspective. In: Footitt, R.G.; Adler, P. H. (Org.), Insect Biodiversity: Science and Society. Oxford: J Wiley & Sons, 2017. v. 1, p. 463-495.

Gonçalves, G.A.S.; Barbosa, F. S.; Palucha, M. Biology and External Morphology of the Immature Stages of *Dirphia moderata* Bouvier (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae) in *Anacardium occidentale* L. Brazilian Journal of Biology, v. 80, n. 1, p.147-157, 2020. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.203025>

Johnson, S.D.; Moré, M.; Amorim, F.W.; Haber, W.A.; Frankie, G.W.; Stanley, D.A.; Cocucci, A.A.; Raguso, R.A. The long and the short of it: a global analysis of hawkmoth pollination niches and interaction networks. Functional Ecology, v.31, p.101-115, 2017. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12753>

Lemaire, C. The saturniidae of America- Hemileucinae. Keltern: Goecke and Evers, 2002. 1714p.

Lorine, L.M. A taturana: aspectos biológicos e morfológicos da *Lanomia obliqua*. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo (EDIUPF), 1999. 67p.

May, C.Y. 2012. Oil palm: a versatile ingredient for food and non-food applications. [http://mpoc.org.my/upload/POTS\\_INDIA2012\\_DatukDrChoo](http://mpoc.org.my/upload/POTS_INDIA2012_DatukDrChoo). 01 July 2019.

Mitter, C.; Davis, D.R.; Cummings, M.P. Phylogeny and evolution of Lepidoptera. Annual Review of Entomology, v. 62, p.265-283, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurevento-031616-035125>.

Parra, J.R.P.; Haddad, M.L. Determinação do número de ínstares de insetos. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 1989. 49p.

Pérez, L.A.L.; Domínguez, J.C.; Fleischer, F.D.; García, J.A.; Torres, A.A. Species richness and abundance of Saturniidae (Lepidoptera) in a tropical semi-deciduous forest of Veracruz, Mexico and the influence of climatic variables. Revista Mexicana de Biodiversidade, v.88, p.173-182, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.10.020>.

Posso, C.E.; Cardona, C.; Valor, J.F.; Moreles, H. Caracterización de una nueva proteína como factor responsable de la resistencia de *Phaseolus vulgaris* a *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae). Revista Colombiana de Entomologia, v.15, n.2, p. 3-9, 1989. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000500005>.

Santos, F.L.; Casagrande, M.M.; Mielke, O.H.H. Saturniidae and Sphingidae (Lepidoptera, Bombycoidea) assemblage in Vossoroça, Tijucas do Sul, Paraná, Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.87, p.843-860, 2015. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140368>.

Specht, A.; Formentini, A.C.; Corseuil, E. Biologia de *Automeris illustris* (Walker) (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). Revista Brasileira de Zoologia, v. 23, n.2, p. 537-546, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000200029>

Specht, A.; Formentini, A.C.; Corseuil, E. Biologia e aspectos morfológicos dos estágios imaturos de *Automeris naranja* Schaus (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). Revista Brasileira de Zoologia, v.24, n.3, p.523-534, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752007000300001>.

Wahid, M.B.; Abdullah, S.N.A.; Henson, I.E. Oil Palm - Achievements and Potential. Plant Production Science, v.8, n.3, p. 288-297, 2004. <https://doi.org/10.1626/pps.8.288>.

Zanuncio, J.C.; Fagundes, M.; Araújo, M.S.S.; Evaristo, F.C. Monitoramento de lepidópteros, associados a plantios de eucalipto na região de Açailândia (Maranhão), no período de agosto/90 a julho/91. Acta Amazonica, v.22, n.4, p. 615-622, 1992. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921992224622>.

**CAPÍTULO 3. BIOLOGIA E MORFOMETRIA DE *Brassolis sophorae* LINNEAUS (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) EM PALMA DE ÓLEO NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>CC</b>	Comprimento do corpo
<b>ØT</b>	Diâmetro do tórax
<b>E</b>	Envergadura
<b>CAA</b>	Comprimento da asa anterior
<b>AAA</b>	Altura da asa anterior
<b>CAP</b>	Comprimento da asa posterior
<b>AAP</b>	Altura da asa posterior
<b>TA</b>	Tamanho da antena
<b>NA</b>	Número de antenômeros
<b>M</b>	Massa

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Localização geográfica ( $2^{\circ} 31'33.9''\text{S}$  e  $48^{\circ}45'49.1''\text{W}$ ) das áreas de coleta de lagartas de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE). Amazônia Oriental, Brasil.
- Figura 2** Ciclo de vida de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil. Ovo individualizado (A); Postura gregárias (B,C,D); Cápsula cefálica (E); Lagarta no primeiro instar (F); Lagarta no sexto instar (G); Pupas. À esquerda, fêmeas e à direita, macho (H); Desenho esquemático mostrando o dimorfismo entre as pupas (I); indivíduos adultos. Macho, vista dorsal (J); macho, vista ventral (K); fêmea, vista dorsal (L); fêmea, vista ventral (M). Barra = 1mm.
- Figura 3** Parâmetros morfométricos do adulto de *Brassolis sophorae*. Comprimento do corpo (CC), diâmetro do tórax ( $\emptyset T$ ), envergadura (E), comprimento da asa anterior (CAA), altura da asa anterior (HAA), comprimento da asa posterior (CAP), altura da asa posterior (HAP), comprimento da antena (CA), número de antenômeros (NA) e massa corpórea em gramas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre médias (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ), as barras representam o desvio padrão entre as médias,  $n=10$ . \*Os valores reais de massa foram multiplicados por 5, para facilitar a visualização na escala gráfica.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Duração (dias) do ciclo biológico de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), alimentados com dieta natural a base de folhas de palma de óleo, variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil.
- Tabela 2** Tempo, comprimento, largura, massa e largura de cápsulas cefálicas de ínstaes larvais de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil.

## **Biologia e morfometria de *Brassolis sophorae* Linneaus (Lepidoptera: Nymphalidae) em palma de óleo na Amazônia Oriental**

### **Resumo**

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma espécie da família arecaceae de origem africana, cultivada em regiões tropicais úmidas da África, Ásia e América, representa a mais importante fonte de óleo vegetal para o consumo humano. A lagarta *Brassolis sophorae* Lineaus é considerada praga desfolhadora primária de palma de óleo. Dependendo da área foliar afetada pode causar danos expressivos para as plantas. Informações sobre a biologia da espécie foram obtidas em outros países produtores de palma. O cenário atual de pesquisas fitossanitárias na região é irrisório, frente à importância da cultura de palma de óleo para o estado do Pará e para o Brasil, poucos são os estudos taxonômicos, biológicos e ecológicos realizados com espécimes coletados nessa microrregião. O ciclo total da espécie foi de 136 dias para machos e 138 dias para fêmeas. O estágio imaturo (ovo) durou, em média, 30,36 dias. O estágio larval teve seis instares, com duração média de 79 dias. A pupa durou 14 dias, tanto para machos como para fêmeas e nesta fase já foi possível a diferenciação sexual. O adulto teve longevidade de 12 e 14 dias para macho e fêmea, respectivamente. A razão média de crescimento da cápsula encefálica foi de 1,19. As antenas dentro da espécie não apresentam um dimorfismo sexual, sendo em ambos os sexos do tipo clavada. Na fase adulta as variáveis morfológicas analisadas, com exceção das variáveis comprimento de antena e número de antenômeros, todas as demais as estruturas das fêmeas foram superiores, comparações foram realizadas pelo teste Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** lagartas desfolhadoras; região tropical; danos

**Abstract**

The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) is a species of the family arecaceae of African origin, grown in humid tropical regions of Africa, Asia and America, representing the most important source of vegetable oil for human consumption. The state of Pará has an area planted with oil palm of approximately 250,000 ha, of which Pará accounts for 86.44% of the national production of oil palm. The *Brassolis sophorae* L. caterpillar, considered a primary oil palm leaf stripper pest. Depending on the affected leaf area can cause significant damage to plants. Information on the biology of the species has been obtained in other palm producing countries. The current scenario of phytosanitary research in the region is derisory, due to the importance of the oil palm crop to the state of Pará and to Brazil, few taxonomic, biological and ecological studies are carried out with specimens collected in this micro-region. The total cycle of the species was 136 days for males and 138 days for females. The immature (egg) stage lasted, on average, 30.36 days. The larval stage had six instars, with an average duration of 79 days. The pupa lasted 14 days for both males and females and at this stage sexual differentiation was already possible. The adult had longevity of 12 and 14 days for male and female, respectively. The mean growth rate of the brain capsule was 1.19. The antennas within the species do not present a sexual dimorphism, being in both sexes of the nailed type. In the adult phase, the morphological variables analyzed, except for the variables antenna length and number of antenomers, all other structures of the females were superior, comparisons were performed by Newman-Keuls test ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** Caterpillars; tropical region; damages;

## Introdução

A palma de óleo como qualquer outra espécie vegetal apresenta os seus problemas fitossanitários, no caso dessa espécie em estudo, pela forma de cultivo (monocultivo) e o plantio em grandes áreas contínuas, proporciona uma forma de atração diferenciada, o que gera possibilidade de agravos no ataque de pragas.

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma espécie da família arecaceae de origem africana, cultivada em regiões tropicais úmidas da África, Ásia e América, e, segundo Wahid et al. (2004), representa a mais importante fonte de óleo vegetal para o consumo humano. May (2012), mostra que mais de 80% é destinada para indústria de alimentos e, segundo Brandão e Schoneveld (2015), o estado do Pará apresenta uma área plantada com palma de óleo de aproximadamente 250.000 ha, desse total, o Pará responde por 86,44% da produção nacional de palma de óleo.

A lagarta *Brassolis sophorae* Lineu, considerada praga desfolhadora primária de palma de óleo (Lordelo, 1949; Rai, 1973). São gregárias durante todos os estádios e vivem reunidas durante o dia em abrigos construídos com os folíolos da palmeira unidos com fios de seda produzidos pelas glândulas salivares. São consideradas pré-sociais e apresentam comportamento forrageiro cooperativo, pois utilizam trilhas impregnadas com feromônios quando saem para forragear, sempre à noite (Mariconi, 1952; Peña, 2012). São tidas como pragas desfolhadoras. Dependendo da área foliar afetada podem causar danos expressivos para as plantas (Jucá, 2019), afetando as trocas gasosas da planta como: fotossíntese, transpiração e condutância estomática, provocando danos consideráveis a produção, pois a produção de fotoassimilados será diminuída o que poderá alterar a precocidade, produtiva e crescimento da planta.

Aspectos bioecológicos e Informações sobre a biologia da espécie foram obtidas em outros países produtores de palma. O cenário atual de pesquisas fitossanitárias na região é irrisório, frente à importância da cultura de palma de óleo para o estado do Pará e para o Brasil, poucos são os estudos taxonômicos, biológicos e ecológicos realizados com espécimes coletados nessa microrregião. Esse cenário pode ser reflexo da estagnação da cultura da palma até 2010 e o pouco incentivo para a pesquisa fitossanitária na região. (Oliveira et al , 2018).

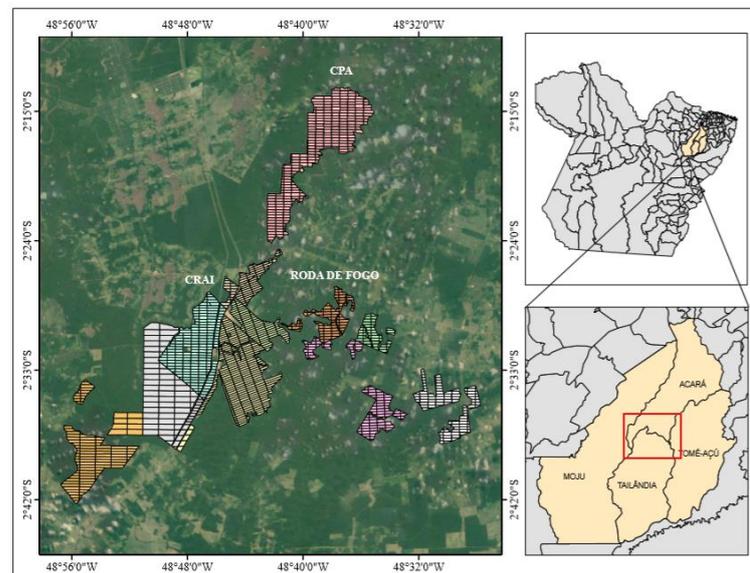
Diante do exposto, o referido trabalho visa estudar a biologia e a morfologia da espécie, bem como desenvolver um protocolo de criação em laboratório de forma que seja possível produzir indivíduos em condições controladas, visando com isso subsidiar

informações para ações de manejo que visem minimizar os danos causados para cultura da palma de óleo, no estado do Pará.

## Materiais e métodos

### Coleta

Inicialmente, foram coletados indivíduos da lagarta *Brassolis sophorae* no campo, em plantas de palma de óleo da empresa Agropalma S/A, sob coordenadas 02°31'33.9" S 48°45'49.1" W (Fig. 1).



**Fig. 1.** Localização geográfica (2° 31'33.9"S e 48°45'49.1" W) das áreas de coleta de lagartas de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE). Amazônia Oriental, Brasil.

### Criação em laboratório

Após a coleta, as lagartas foram para o Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA) localizado a 1 ° 45 "59.82 'S 48 ° 43" 77.16' W, pertencente a Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil. Foram acondicionadas recipientes de plástico com volume de 20 L, com dimensões de 17,9 cm de altura, 32,3 cm de largura e 46,7 cm de comprimento, coberto por tecido do tipo voal e preso por liga plástica, mantendo o gregarismo é característico na

espécie. Foram mantidas em temperatura a  $\pm 26^{\circ}\text{C}$ , com troca de alimentação natural a base de folhas de palma de óleo da variedade Tenera, diariamente. As avaliações foram realizadas após a primeira geração.

Para a preservação das folhas estas foram acondicionadas em refrigerador a  $20^{\circ}\text{C}$ . A cada troca de alimentação as folhas receberam um tufo de algodão umedecido com água destilada na base do folheto para manter a turgescência das folhas.

As análises morfométricas foram realizadas a cada troca de instar, medindo-se comprimentos e larguras, de todas as fases do inseto, com auxílio de paquímetro digital. A massa e a caracterização de coloração também foram realizadas.

Ovos e posturas da primeira geração foram acondicionados em placas de petri de dimensões 150 x 20 mm, forrados com papel de filtro levemente umedecido diariamente e mantido em B.O.D. a temperatura  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade 70% e fotofase 12h.

As cápsulas cefálicas foram medidas com auxílio de microscópio estéreo Olympus com câmera acoplada. Usando o software Toupview (x86).

A análise biométrica foi feita para diferenciar os instares a cada troca de cápsulas cefálicas das lagartas, de acordo com Parra e Haddad (1989). A partir das medições das mesmas, o crescimento foi baseado no modelo linear de Dyar (1890).

No período de pré-pupa, quando as lagartas pararam de se alimentar e apresentaram comportamento mais retraído, cada pupa formada e já enrijecida foi individualizada em potes de polipropileno, com volume de 500 ml, redondos e translúcidos, cobertos com tecido voal e com um tufo de algodão no fundo para a manutenção da umidade. Foi realizado a sexagem na fase pupal (Butt e Cantu., 1962) e calculo a razão sexual conforme a fórmula:

$$RS = \frac{\text{número de fêmeas}}{(\text{número de machos} + \text{número de fêmeas})} \cdot (\text{Posso et al., 1989})$$

Os adultos foram acondicionados em gaiolas de dimensões 0,40 x 0,40 x 0,40 m, para largura, altura e profundidade, respectivamente, recobertas com tecido voal. Avaliou-se morfometricamente e biologicamente, sendo avaliados os parâmetros de comprimento do corpo (CC), diâmetro do tórax ( $\emptyset T$ ), envergadura (E), comprimento da asa anterior (CAA), altura da asa anterior (HAA), comprimento da asa posterior (CAP), altura da asa posterior (HAP), comprimento da antena (CA), número de antenômeros (NA) e massa corpórea, assim como seu comportamento e longevidade.

Para avaliar possíveis diferenças morfométricas, os dados foram submetidos ao teste

de média Neuwman – Keus ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e discussão

A duração do ciclo de *Brassolis sophorae* em laboratório sob dieta natural com palma de óleo foi de 136 dias para machos e 138 dias para fêmeas (Tabela 1).

**Tabela 1**

Duração (dias) do ciclo biológico de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), alimentados com dieta natural a base de folhas de palma de óleo, variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil.

Estágio	Tempo (dias)
Ovo	30,36 ± 0,02
Lagarta	78,86 ± 0,6
Pupa (macho)	14,04 ± 0,06A
Pupa (fêmea)	14,31 ± 0,02A
Adulto (macho)	12,7 ± 0,28 b
Adulto (fêmea)	14,1 ± 0,26 a

Letras maiúsculas comparam pupa na coluna e letras minúsculas comparam sexo de adultos na coluna, letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre médias (Newman-Keuls  $P < 0,05$ ).

### Ovo

Os ovos foram encontrados presos aos folíolos e também ao tecido voal que recobre as gaiolas, a postura é gregária, organizados lado a lado e presos entre si, com média de  $114 \pm 0,06$  ovos agrupados, mas também há em grupos menores, influenciado muito pelo ambiente proporcionado para este estágio da vida, uma vez que pode-se observar que na gaiola com mudas de palma de óleo no interior, apresentaram maior número de ovos por postura, onde muito provavelmente no ambiente externo as variáveis ambientais como : temperatura, umidade, luminosidade, ventilação, déficit de pressão de vapor e mais combinações destas variáveis, estejam proporcionando ao inseto muito mais estimulado ao seu metabolismo reprodutivo, visto que todo ser vivo é fruto de uma carga genética mais efeitos do meio ambiente (Gallo et al., 2002).

Possuem forma circular, com base levemente achatadas. Assim que são ovipositados, os mesmos apresentam coloração amarela, após aproximadamente 5 dias, os mesmos tornam-

se rosa claro, até a proximidade da eclosão, quando toma tonalidade acinzentada, principalmente próximo a micrópila, a qual aparece com um ponto negro. Quando os ovos não foram fertilizados, os mesmos continuaram na coloração bege. Suas dimensões foram, 1,61 mm de diâmetro central e 1,82 mm de altura (Fig. 2A, B, C, D)

A viabilidade dos ovos foi de  $87,02 \pm 0,23$  %. Pode-se também observar diferença entre os ovos das gaiolas maior e menor, assim como as posturas de campo, quanto a viabilidade, mostrando que quanto mais próximo do ambiente natural nesta face, maiores as chances de fecundação e postura viável. O tempo entre postura e eclosão foi de 30 dias (Tabela 1), muito acima do tempo em condições ambientes, muito provavelmente os ovos passaram pelo período de diapausa, pela diferença de ambiente (Gardiner 1958).

### *Lagarta*

As lagartas de *Brassolis sophorae* não apresentam muitas diferenciações nas características físicas durante a fase larval. Recém eclodidas apresentam coloração marrom claro, com estreitas faixas longitudinais pelo corpo, seis no total (Fig. 2F). Estas, no segundo instar começam a apresentar uma coloração de marrom mais escuro, enquanto que as faixas começam a apresentar no intervalo de cada duas uma coloração bege. Ao chegarem no terceiro instar, já com a coloração marrom escura, as faixas que antes eram 6, tornam-se 3 faixas mais largas de cor bege e laterais brancas, localizadas longitudinalmente no dorso e uma em cada lateral do inseto. Até o fim desse estágio, as lagartas continuam com essas características de coloração (Fig. 2G).

Outra característica marcante no inseto é sua capsula cefálica, a qual nas larvas recém-eclodidas apresentam-se na cor negra e bem maiores que a largura do corpo, com o desenvolvimento, a diferença de largura entre a cabeça e o corpo vai diminuindo, porém sempre se distinguindo. A coloração da capsula muda a partir do segundo instar, a qual deixa de ser negra e passa a ser marrom claro, com duas máculas marrom escuro, uma em cada lateral da frente (Fig. 2E).

Durante toda fase de larva tanto o corpo e cabeça, são cobertos com pequenas cerdas na cor amarelo claro, as mesmas não apresentam malefícios a saúde de quem as toca-las, como erucismo, muito provavelmente servindo como órgão sensorial de defesa para o inseto (Triplehorn e Johnson, 2011)

Seu hábito alimentar, mesmo em ambiente não natural, começa no final da tarde

aumentando a atividade durante a noite, quando amanhece as lagartas buscam seus abrigos para passarem o dia. Assim que eclodem não se alimentam logo da dieta natural oferecida, passando até 48 horas se alimentando do córion proveniente dos ovos da postura.

Apresentam durante toda a fase, comportamento gregário, sempre orientadas por fios de seda que deixam no caminho. Segundo Ambrogi et al. (2016), este comportamento dá-se pela presença de compostos químicos nos fios de seda, os quais ainda não foram identificados.

A razão de crescimento da cápsula cefálica foge a média de crescimento da regra de Dyar (1890), uma vez que apresenta média de 1,19 e o proposto pelo autor é 1,4. Este resultado diferencia-se do encontrado por Ambrogi et al. (2016), o qual concordou com a média padrão de 1,4.

A média de duração do período larval foi de 109 dias, sendo 4 dias destinados a pré-pupa, apresentando 6 instares, assim como no trabalho de Ambrogi et al. (2016), confrontando mais uma vez os resultados de Marcicano (2007), o qual defende que esta espécie pode apresentar número de instares variados.

Quanto a locomoção é importante ressaltar a que o primeiro par de pernas é atrofiado, bem reduzidos e apenas as pernas médias e posteriores locomovem a lagartas, este fato é característico da família Nymphalidae, cujo o nome lembra a fase de ninfa, presente em alguns insetos. Também nas pernas, não há a presença de garras.

**Tabela 2**

Tempo, comprimento, largura, massa e largura de cápsulas cefálicas de ínstar larvais de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil.

	Lagarta				Cápsula cefálica	
	Tempo (dias)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Massa (g)	Largura (mm)	Razão de crescimento
<b>1° instar</b>	12.16 ± 0.18	4,28 ± 0,09A	0,81 ± 0,03A	-	2,39 ± 0.05A	-
<b>2° instar</b>	11.16 ± 0,18	5,69 ± 0,15B	1,41 ± 0,03B	0,01 ± 0,03A	2,79 ± 0.01B	1,24
<b>3° instar</b>	13.32 ± 0,25	16,13 ± 0,11C	2,21 ± 0,04C	0,02 ± 0,09A	2,95 ± 0.01C	1,06
<b>4° instar</b>	11.79 ± 0,28	25,89 ± 0,39D	3,79 ± 0,23D	0,06 ± 0,02B	3,9 ± 0.01D	1,32
<b>5° instar</b>	12.9 ± 0,32	35,81 ± 1,02E	5,19 ± 0,19E	0,21 ± 0,07C	5,04 ± 0.01E	1,29
<b>6° instar</b>	17,53 ± 0,34	47,41 ± 5,28F	5,98 ± 0,18F	0,51 ± 0,08D	5,2 ± 0.08F	1,03

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas entre médias (Newman-Keuls  $P < 0,05$ )

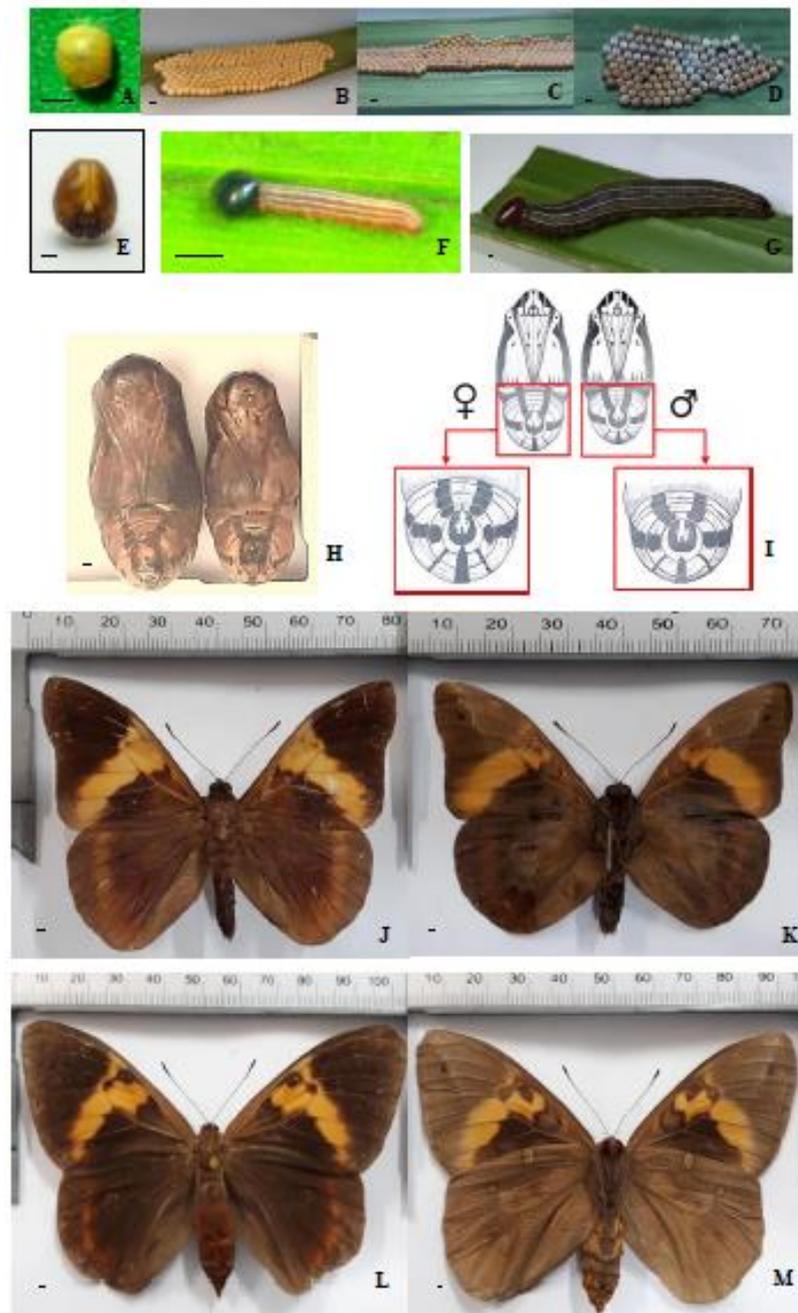
### *Pupa*

A pupa é do tipo fixa, nua, inicialmente de coloração bege com faixas marrons, com o passar do tempo, elas deixam de ser bege e passa a coloração marrom. Possui cremaster pouco desenvolvido, o qual é muito importante, uma vez que as pupas ficam suspensas nas folhas, tecido, paredes, locais que a lagarta considera segura para completar o ciclo, desde modo a estrutura ajuda na fixação das mesmas, pela parte posterior do corpo, com o auxílio dos fios de seda liberados pelas lagartas (Fig. 2H).

Quanto as suas medidas, apresentou comprimento de 2,15 e 2,75 cm, diâmetro do tórax de 1,02 e 1,07 cm e massa de 1,51 e 2,21 g, para machos e fêmeas, respectivamente. Durando em média 14 dias nessa fase.

Pode-se observar diferenças sexuais, já nesta fase, nos últimos segmentos abdominais. O oitavo segmento da pupa feminina apresentou uma secção, abertura da bolsa copuladora neste segmento, levemente proveniente do nono segmento. No macho, o 8° segmento não tem divisão, mas o 9° segmento tem 2 almofadas redondas, quase imperceptíveis, em cada lado da

linha ventral (Fig. 2I). Esta característica assemelha-se a da espécie *Pectinophora gossypiella*, descrita por Butt e Cantu (1962). A razão sexual observada foi de 0,47.



**Fig. 2:** Ciclo de vida de *Brassolis sophorae* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), oriundos de criação alimentada com dieta natural a base de folhas de palma de óleo variedade Tenera, em laboratório. Amazônia Oriental, Brasil. Ovo individualizado (A); Postura gregárias (B, C, D); Cápsula cefálica (E); Lagarta no primeiro instar (F); Lagarta no sexto instar (G); Pupas. À esquerda, fêmeas e à direita, macho (H); Desenho esquemático mostrando o dimorfismo entre as pupas (I); indivíduos adultos. Macho, vista dorsal (J); macho, vista ventral (K); fêmea, vista dorsal (L); fêmea, vista ventral (M). Barra = 1mm.

### *Adulto*

O adulto desta espécie apresenta características marcantes de dimorfismo sexual, nas asas anteriores, tamanho, sendo a fêmea, maior que o macho. A antena entre os sexos não apresentou diferença, uma vez que ambas são clavadas, além do número de antenômeros e comprimento da antena não apresentarem diferença significativa, estatisticamente (Fig. 3).

As variáveis morfológicas analisadas tiveram os seguintes resultados para machos e fêmeas, respectivamente, Comprimento do corpo 28,77 e 34,30 mm; Diâmetro do tórax, 6,33 e 9,96 mm; envergadura, 78,78 e 99,99 mm; Comprimento da asa anterior, 41,25 e 43,94 mm; altura da asa anterior, 26,57 e 33,03 mm; comprimento da asa posterior, 31,43 e 36,11 mm; altura da asa posterior, 19,38 e 26,82 mm; tamanho da antena, 16,40 e 16,84 mm; número de antenômeros 30,70 e 30,80 mm e massa 0,37 e 1,09 gramas.

Nos machos, a visão dorsal as asas anteriores apresentam coloração marrom intenso, com uma faixa alaranjada larga ligando a margem costal a margem anal continuamente. O ápice tem formato levemente pontiagudo, assemelhando a mesma a um triângulo (Fig. 2J). Nas fêmeas, a característica de coloração é a mesma, porém apresenta uma falha na faixa alaranjada em forma de “Y”, saindo da margem costal e o ápice de suas asas se apresentam com bordas arredondadas (Fig. 2L).

Nas asas posteriores, a coloração também é marrom intenso, apenas com uma faixa estreita levemente alaranjada, ligando as margens, isso em ambos os sexos.

Na visão ventral, o macho apresenta coloração mais intensa, ainda é possível observar a faixa alaranjada na asa anterior, sendo que passa a apresentar um marrom mais escuro na parte mais externa da asa e mais claro do centro até a margem ligada ao corpo (Fig. 2K). Apresenta também uma mácula arredondada entre as nervuras R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub>. Entre as nervuras R<sub>4</sub> e R<sub>3</sub> aparecem pequenas machas estreitas brancas, assim como entre as nervuras R<sub>3</sub> e R<sub>2</sub>.

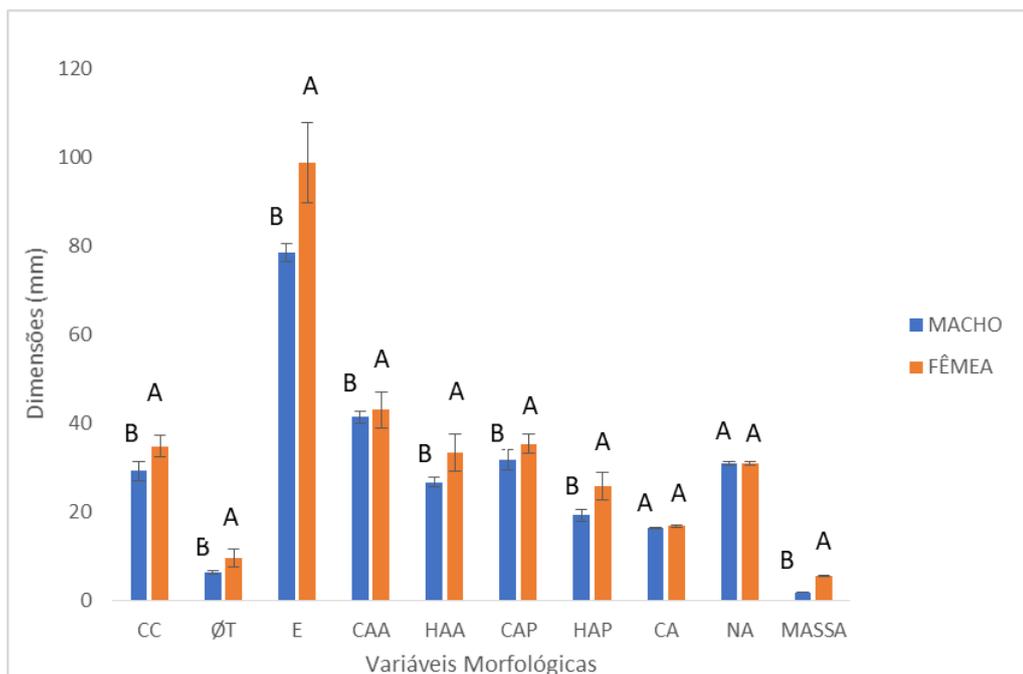
Já nas asas posteriores, aparecem somente as diferenciações da coloração marrom já descritas na asa anterior.

Nas fêmeas, a visão ventral difere-se do macho, apresentando também a faixa alaranjada, mas agora com a tonalidade marrom intenso da faixa para a extremidade interna que liga ao corpo, enquanto da faixa para a extremidade externa da asa a coloração é bege claro. Também aparecem máculas no mesmo local que os machos, porém agora menores e de

coloração menos intensa. As faixas brancas, em forma de arco, aparecem desde a nervura  $R_2$  até a nervura  $M_1$  (Fig. 2M).

As asas posteriores tem a coloração marrom, apresentando máculas de mesma coloração, porém com bordas mais escuras, assemelhando-se a gotas d'água na superfície.

O corpo do adulto apresenta coloração marrom na face dorsal em ambos os sexos, desde a cabeça até o último segmento do abdômen. Já na face ventral, as características continuam as mesmas, diferenciando-se somente pelo abdômen da fêmea apresentar-se com coloração alaranjada. Quanto a morfometria, o abdômen do macho é mais estreito e com o ápice truncado, enquanto que na fêmea é bem largo e pontiagudo, característica própria para facilitar a oviposição.



**Fig. 4.** Parâmetros morfométricos do adulto de *Brassolis sophorae*. Comprimento do corpo (CC), diâmetro do tórax (ØT), envergadura (E), comprimento da asa anterior (CAA), altura da asa anterior (HAA), comprimento da asa posterior (CAP), altura da asa posterior (HAP), comprimento da antena (CA), número de antenômeros (NA) e massa corpórea em gramas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre médias (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ), as barras representam o desvio padrão entre as médias,  $n=10$ . \*Os valores reais de massa foram multiplicados por 5, para facilitar a visualização na escala gráfica.

## Conclusão

A duração do ciclo de *B. sophorae* Linnaeus em laboratório sob dieta natural com palma de óleo é de 166 dias para machos e 168 dias para fêmeas, respectivamente. É possível desenvolver a criação do inseto em ambientes controlados para o conhecimento da biologia a qual pode contribuir para ações que visem medidas de controle dessa importante praga.

## Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedeu ao primeiro autor a escola de mestrado. Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, pelo apoio intelectual e orientação. A empresa Agropalma S/A, pela permissão de pesquisa, apoio logístico e financeiro.

## Referências

- Ambrogi, B.G., Zevallos, D. M. P, Leite, J. C., Souto, L. S., Queiroz, A. F. O., Moreira, S. M. (2016). Trail-following behaviour and biological aspects of the gregarious caterpillar *Brassolis sophorae* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Austral Entomology* 55, <https://doi.org/10.1111/aen.12197>
- Brandão, F., Schoneveld, G (2015). The state of oil palm development in the Brazilian Amazon: Trends, value chain dynamics, and business models. *Working Paper* 198, <http://dx.doi.org/10.17528/cifor/005861>
- Butt, B.A., Cantu, E. 1962. Sex determination lepidopterous pupae. USDA, Washington.
- Jucá, A.C.C., Respostas Morfofisiológicas em Mudanças de Coqueiro após Desfolha Artificial em Simulação ao Ataque de *Opsiphanes invirae* (Lepidoptera: Nymphalidae). 2019. Dissertação ( Mestrado em Agronomia)-Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019.
- Dyar, H.G., 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche* 5. <http://dx.doi.org/10.1155/1890/23871>
- Gallo, D.; Nakano, O.; Neto, S.S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Filho, E.B.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. 2002. *Entomologia agrícola*, tenth ed. FEALQ, Piracicaba.

- Gardiner, B.O.C., 1982. A silkmoth Rearer's Handbook, First ed. The Amateur Entomologists Society, Hanworth.
- Lordello, L. G. E. *Brassolis sophorae lurida* Stich, séria praga das palmáceas. Sitios e Fazendas, São Paulo, v. 14, n. 11, p. 9-17, 1949.
- Maricone, F. A. M. As lagartas das palmeiras. A-*Brassolis sophorae* (Lineu, 1758); B-*Brassolis astyra* Godart, 1821. O Biológico, v. 18, p. 103-107, 1952.
- May, C Y (2012). Oil palm: a versatile ingredient for food and non-food applications.[http://mpoc.org.my/upload/POTS\\_INDIA2012\\_DatukDrChoo.pdf](http://mpoc.org.my/upload/POTS_INDIA2012_DatukDrChoo.pdf) (accessed 01 july 2019).
- Marcicano, M. D. L. 2007. Aspectos Bioecológicos de *Brassolis sophorae laurentii* Stichel, 1925 (Lepidoptera: Nymphalidae: Brassolinae) no estado de Alagoas. In: Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas
- Oliveira, T.A., Lemos, W.P., Tinôco, R.S., Martins, I.C.F. Lepidópteros Desfolhadores de Palma-de-óleo no Estado do Pará, Documento 434, 64p. Embrapa Amazônia Oriental. 2018.
- Peña, Y. Y. C. Bioecología del “gusano de la palma”, *Brassolis sophorae* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), en Caracas, Venezuela. 2012. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidad Central de Venezuela, Maracay.
- Posso, C.E., Cardona, C., Valor, J.F., Moreles, H., 1989. Caracterización de una nueva proteína como factor responsable de la resistencia de *Phaseolus vulgaris* a *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae). Rev. Colomb. Entomol. 15(2), <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000500005>.
- Rai, B. K. *Brassolis sophorae* and *Castnia daedalus*: chemical control of these major pests of coconut in Guyana. Journal of Economic Entomology, Annapolis, n. 66, p. 177-180, 1973.
- Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F. 2011. Estudo dos insetos: tradução da 7ª edição de Borror and Delong's introduction to the study of insects. São Paulo, Cengage Learning, 809p.
- Wahid, M.B., Abdullah, S.N.A., Henson, I. E. (2004). Oil Palm - Achievements and Potential. Plant Prod Sci. 8 (3), <https://doi.org/10.1626/pps.8.288>

**CAPÍTULO 4. SOBREVIVÊNCIA DE LAGARTAS DAS PALMEIRAS APÓS EXPOSIÇÃO A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOB DIETA NATURAL COM PALMA DE ÓLEO**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Ci</b>	Concentração Inicial
<b>Cf</b>	Concentração Final
<b>Vi</b>	Volume Inicial
<b>Vf</b>	Volume Final

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Lagarta *B. sophorae* antes e depois de infectada por agentes entomopatogenicos. **A.** Lagarta saudável antes da aplicação. **B.** Lagarta infectada com o fungo *B. bassiana*. **C.** Lagarta infectada com o fungo *M. anisopliae*. **D.** Lagarta infectada com a bactéria *B. Thuringiensis*.
- Figura 2** Análise de sobrevivência de lagartas *B. sophorae* sob exposição a diferentes suspensões de agentes entomopatogênicos

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Densidade e viabilidade de suspensões de fungos entomopatogênicos, coletados em áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia, Brasil.

## **Sobrevivência de lagartas das palmeiras após exposição a fungos entomopatogênicos sob dieta natural com palma de óleo**

**\*Artigo submetido a revista *Journal of Oil Palm Research***

### **Resumo**

A lagarta *Brassolis sophorae* é uma praga de importância econômica para a cadeia produtiva da Palma de óleo, devido causar grandes desfolhamentos no Brasil. E atualmente, é utilizado somente *Bacillus thuringiensis*, tornando-se um risco para a produção, pois pode ocasionar tolerância aos indivíduos com aplicações sucessivas, fato que ocorre no cotidiano de alguns produtores. Objetivou-se avaliar a sobrevivência de lagartas de *B. sophorae* de quarto instar, expostas a isolados de fungos entomopatogênicos, em laboratório. Os tratamentos foram *B. thuringiensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e controle com água. Foram avaliados os tempos médios e médias de sobrevivência. Utilizou-se como dieta folíolos de palma de óleo. As suspensões fúngicas foram ajustadas para a concentração de  $1 \times 10^8$  esporos viáveis/ml. Níveis de sobrevivência da lagarta após a exposição as suspensões fúngicas, quando em contato com folíolos de palma de óleo, apresentaram diferenças. A cepa do fungo *M. anisopliae* foi a mais eficaz no controle da lagarta. Assim, como a correlação destes resultados com o número e viabilidade de esporos. A análise de Kaplan – Meier revelou que cada lagarta sobreviveu, significativamente menos, após tratamentos com suspensões entomopatogênicas.

**Palavras-chave:** *Brassolis sophorae*; *Beauveria bassiana*; *Metharizium anisopliae*; Análise de Kaplan – Meier

**Abstract**

The *Brassolis sophorae* caterpillar is a pest of economic importance for the oil palm production chain, because it causes great defoliation in Brazil. And currently, only *Bacillus thuringiensis* is used, making it a risk for production, as it can cause tolerance to individuals with successive applications, a fact that occurs in the daily lives of some producers. The objective was to evaluate the survival of fourth instar *B. sophorae* caterpillars, exposed to isolates of entomopathogenic fungi, in the laboratory. The treatments were *B. thuringiensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and control with water. Average times and average survival were evaluated. Oil palm leaflets were used as a diet. The fungal suspensions were adjusted to the concentration of  $1 \times 10^8$  viable spores/ml. Levels of caterpillar survival after exposure to fungal suspensions, when in contact with oil palm leaflets, showed differences. The strain of the fungus *M. anisopliae* was the most effective in controlling the caterpillar. Thus, as the correlation of these results with the number and viability of spores. The Kaplan - Meier analysis revealed that each caterpillar survived, significantly less, after treatments with entomopathogenic suspensions.

**Key words:** *Brassolis sophorae*; *Beauveria bassiana*; *Metharizium anisopliae*; Kaplan - Meier analysis

## Introdução

*Brassolis sophorae* Jacq. é conhecida como praga das palmeiras, em função de se ter registro desta atacando várias espécies de palmeiras: *Elaeis guineenses*, *Euterpe oleraceae*, *Cocus nucifera* e outras. Neste estudo, se deu ênfase a incidência em palma de óleo, onde se tem registro do ataque em várias regiões do mundo: toda América central, Guiana, Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia, Peru, Argentina e Suriname [1]. Segundo Oliveira [2], na região norte do Brasil, estado do Pará, são poucos os estudos sobre taxonomia, biologia e ecologia de pragas desfolhadora para a palma de óleo.

Trata-se de uma praga gregária, em um único abrigo, podendo-se encontrar mais de 300 lagartas [3], no ninho. Apresenta hábito noturno, fica no abrigo durante o dia, saindo a noite para alimentar-se, pois os danos são facilmente percebidos a distância, em função das lagartas consumirem todo o limbo foliar do folíolo, deixando apenas a nervura central. Cada lagarta pode consumir até 600 cm<sup>2</sup> de folhas em um único dia, podendo conseqüentemente desfolhar uma palmeira em poucos dias [4, 5]. Em estudos realizados no Oeste da Malásia, constataram perdas significativas na produtividade de palma de óleo, em função da perda de área foliar por lagarta desfolhadora [6,7].

Segundo Vera [8], a palma de óleo tolera até 10% de perda da área foliar sem comprometimento da produtividade, e 38 lagartas no 5º instar, podem consumir essa área foliar. No Brasil, o estado do Pará é o maior produtor nacional de frutos de palma, respondendo por 90% da produção nacional (1.486.082 T), se caracterizando, portanto, uma cultura bastante importante a região [9].

A incidência da praga na Amazônia é recente, no entanto, se tem registro de ocorrência desta lagarta em várias áreas de plantio de palma de óleo, tanto pela extensão das áreas cultivadas, que vem aumentando, sistema de monocultivo muito praticado, fatores estes que podem estar contribuindo para maior incidência da praga.

O controle biológico tem sido bastante avaliado e gerado excelentes resultados com sustentabilidade ambiental, em vários segmentos da agricultura: controle da lagarta da espiga do milho com *Beauveria bassiana* [10], à broca do colmo da cana de açúcar com *Metarhizium*, *Plutella xylostella* L. com *Bacillus thuringiensis* em brassicas [11]. No entanto, alguns registros já existem de pragas que desenvolveram resistência a alguns controles

naturais, como os relatos de Dickson et al [12] e Perez & Shelton [13] registraram a ocorrência de resistência de *Plutella xylostella* ao *Bacillus thuringiensis* kurstaki.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar em laboratório a viabilidade de controle sobre lagartas desfolhadoras de palma de óleo *B. sophorae* Jacq, com o uso de fungos entomopatogênicos, visando gerar novas alternativas de controle biológico, em alternância ao tradicional com *Bacillus thuringiensis*, visando minimizar a possibilidade da praga adquirir resistência.

## **Materiais e métodos**

### **Lagartas**

As lagartas de 4º instar de desenvolvimento larval, *B. sophorae*, foram obtidas a partir da criação do Laboratório de Entomologia Aplicada, da Universidade Federal Rural da Amazônia, as quais tinham dieta natural a base de folíolos de palma de óleo.

### **Aplicação e avaliação de mortalidade**

Foram realizados seis tratamentos: controle negativo (água destilada), *B. thuringiensis* (controle padrão ou positivo), *M. anisopliae* tópico, *M. anisopliae* atópico, *B. bassiana* tópica e *B. bassiana* atópica. Cada tratamento foi realizado em 5 repetições, utilizando recipiente plástico, com volume de 500 ml, 16,3 cm de comprimento e 11,9 cm de largura. Para recebimento de luminosidade, os recipientes eram translúcidos, também com intenção de proporcionar a entrada de ar, foi retirado uma parte do plástico da tampa e substituído por tecido voal, com dimensões de 10x5cm, de comprimento e largura, respectivamente.

Em cada recipiente, foi aplicado por aspersão com borrifador 5ml, a suspensão entomopatogênica e a água. Pedacos de folíolos de palma de óleo de 16 cm de comprimento, foram utilizados para alimentação das lagartas. Cada repetição recebeu 5 lagartas de 4º instar. As aplicações foram: a) atópicas, quando as lagartas foram postas em contato com os tratamentos somente uma hora após a aplicação sobre os folíolos e b) tópicas, quando os tratamentos foram aplicados sobre os folíolos e as lagartas. Estes métodos visaram observar se há diferença entre a sobrevivência de insetos, quando os conídios já estão a bastante tempo expostos no ambiente, uma vez que a espécie tem atividade noturna e a aplicação é realizada

durante o dia, assim as condições de umidade não propícias em que os conídios se encontravam, poderiam dificultar o mecanismo de ação dos fungos sobre as lagartas. Para a suspensão bacteriana, a aplicação atópica não foi realizada, uma vez que, no ambiente, quando ingeridos esporos de *B. thuringiensis* encontrariam condições propícias para a ação de infecção do inseto.

As avaliações foram realizadas diariamente após a aplicação. Observando-se a morte dos insetos e características de acordo com cada agente. Para confirmar se a mortalidade foi realmente pelo agente desejado, as lagartas mortas foram colocadas em câmaras úmidas (pote cristal 30 ml com tampa de pressão, 31mm de diâmetro, 62mm de altura. Com tampa furada para entrada de ar e algodão umedecido com água destilada na parte interna da tampa) individualizadas, após a esterilização com álcool, hipoclorito (2%) e água destilada, avaliadas diariamente, até 10 dias, aguardando-se a esporulação sobre o inseto, se verde, a morte foi ocasionada por *M. anisopliae*, se branco, por *B. bassiana*. Quando a morte foi por bactéria, as lagartas não apresentaram diferença desde a colocação na câmara, continuando enegrecidas, moles e levemente degradadas. Já as poucas lagartas mortas no tratamento controle com água, continuaram com levemente enegrecidas, contraídas, porem com o corpo rígido, sem deterioração.

### **Suspensão bacteriana**

A suspensão bacteriana foi a partir do produto comercial Thucicide<sup>®</sup> WP (Biocontrole). A dosagem utilizada foi de acordo com as recomendações do fabricante.

### **Fungos entomopatogênicos**

Os fungos selecionados foram provenientes de amostras de solos, coletadas em áreas comerciais de plantio de palma de óleo, pertencentes a empresa Agropalma S/A, situada no Estado do Pará, na Amazônia Brasileira, Brasil, pois cepas geograficamente regionais e adaptadas a região nativa, são mais eficientes. A partir das amostras foram realizados isolamentos para obtenção de placas puras. Foram obtidos 243 fungos e a seleção dos melhores foi partir de *screening* toxicológico através do potencial inseticida sobre larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Tenebrio molitor*, em concentração de  $1 \times 10^8$  esporos viáveis/ml.

Após *screening* toxicológico, nove isolados foram selecionados, sendo cinco do gênero *Metarhizium* e quatro do gênero *Beauveria*, os quais foram avaliados sob diferentes

concentrações. Sendo escolhidos os isolados que causaram mortalidades em menor tempo: UFRA M62 (Gênero *Metarhizium*) e UFRA B05 (Gênero *Beauveria*), os quais utilizados neste trabalho.

### **Determinação da densidade e viabilidade dos esporos da suspensão fúngica**

As suspensões fúngicas foram preparadas a partir colônias monospóricas dos isolados selecionados, utilizando-se cinco placas com colônias de cada fungo, as quais foram raspadas com auxílio de alças de Drigalski e água destilada e estéril. A suspensão foi despejada em erlenmeyers de 500 ml, e adicionado 100 ml de água destilada estéril, em seguida deixou-se em agitação com barra magnética por 30 min.

As densidades de suspensão de conídios foram medidas usando-se um Hemocitômetro melhorado Neubauer (Incyto DHC-NO 1, Chungnam, Coréia) e observado em microscópio Leica DM500 Brightfield (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com Ampliação de 400 ×. Todas as suspensões de fungos foram ajustadas para  $\sim 1 \times 10^8$  conídios / mL, depois de diluído com água destilada, usando-se a seguinte fórmula:  $F_c \times F_v = S_c \times S_v$ , onde  $F_c$  = final concentração,  $F_v$  = volume final,  $S_c$  = concentração de estoque e  $S_v$  = volume de estoque. Para maior precisão, necessitou-se da alteração da profundidade focal ao microscópio visando distinguir conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, uma vez que possuem paredes celulares do tipo conspícuas, a partir de gotículas formadas após a adição de água à suspensão emulsificada.

Também foi realizada a determinação da porcentagem de germinação para os isolados, Espalhou-se, com a ajuda de alça de Drigalski, 100 µL de cada suspensão fúngica, contendo  $10^8$  conídios/mL em placas de petri de 15 cm de diâmetro, contendo o meio de cultura BDA (Batata, dextrose e ágar) e antibiótico estreptomicina a 0,5%. Após a vedação com Parafilm®, as placas foram acondicionadas em incubadoras B.D.O. a 25°C por período de 18 – 24 horas e fotofase de 14h.

A porcentagem de germinação por isolado fúngico foi determinada a partir da contagem de esporos na placa de Petri com BDA, utilizando-se o Microscópio Leica DM500 Brightfield (400 ×), em triplicatas. Pode-se confirmar a germinação quando foi observado o tubo germinativo formado, apresentando pelo menos metade do comprimento do conídio. Desta forma apode-se determinar o número de esporos viáveis/ml, a partir da seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de esporos viáveis/ml} = (\text{total do } n^{\circ} \text{ de esporos/ml}) \times (\% \text{ germinação})$$

(1)

$$\text{onde, \% de germinação} = \frac{N^{\circ} \text{ de esporos germinados} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de esporos contados}}$$

### Análises estatísticas

O número médio de dias até a morte das lagartas após a aplicação das suspensões dos fungos entomopatogênicos, comparados ao controle, foram analisados estatisticamente quanto à significância usando ANOVA ( $p < 0,05$ ). Quando os resultados se apresentaram significativos, as médias do tratamento foram separadas a partir do teste de Tukey HSD (Diferença Honestamente Significativa) ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R (version 3.6.1) [14]. O tempo médio de sobrevivência nos tratamentos foram comparados através da análise de sobrevivência de Kaplan – Meier, seguida do teste de Log Rank, no programa R.

### Resultados

#### Densidade e viabilidade de esporos de suspensão de fungos

Densidades de esporos e porcentagens de germinação ajustadas para produzir  $1 \times 10^8$  esporos viáveis/mL para cada suspensão de fungos são apresentados na Tabela 1. As densidades de esporos diferiram-se entre as espécies, sendo o fungo *M. anisopliae* mais denso, e que também apresentou as maiores taxas de germinação.

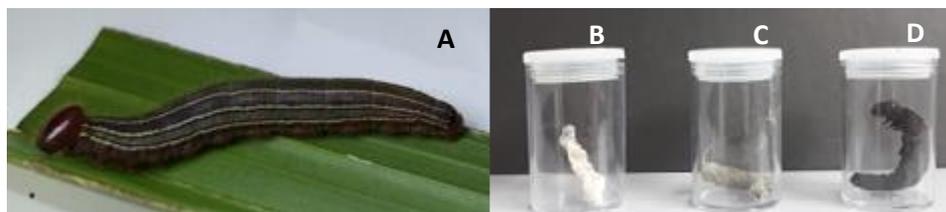
**Tabela 1.** Densidade e viabilidade de suspensões de fungos entomopatogênicos, coletados em áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia, Brasil.

Tratamentos	Esporos/mL ( $\times 10^8$ )	Germinação (%)	Viabilidade de esporos/ml ( $\times 10^8$ )
<i>B. bassiana</i>	$2,07 \pm 0,47^b$	$79 \pm 0,09^b$	$1,95 \pm 0,56^b$
<i>M. anisopliae</i>	$2,76 \pm 0,96^a$	$92 \pm 0,12^a$	$2,64 \pm 0,23^a$

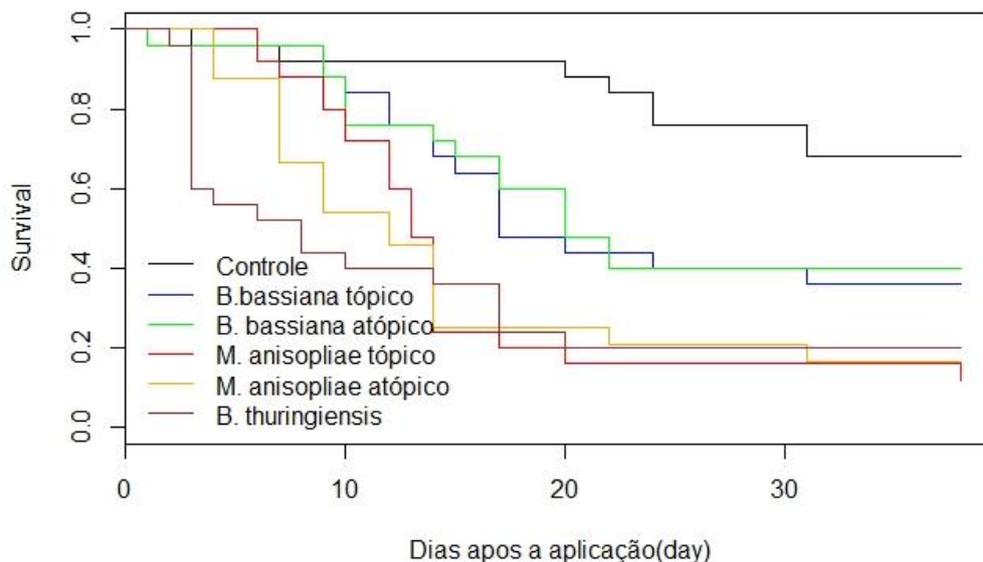
\* Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

## Sobrevivência de lagartas *B. sophorae* após exposição a tratamentos a base de fungos entomopatogênicos

As taxas de sobrevivência sobre a espécie *B. sophorae*, indicaram impactos de mortalidades diferentes para cada agente entomopatogênico (Figura 1), após a exposição as suspensões fúngicas e bacterianas (Figura 2). Como mostrado pela análise de Kaplan-Meier (censurada no dia 35) as lagartas sobreviveram mais tempo no tratamento inoculado somente com água destilada, em comparação com as suspensões entomopatogênicos.



**Figura 5.** Lagarta *B. sophorae* antes e depois de infectada por agentes entomopatogênicos. **A.** Lagarta saudável antes da aplicação. **B.** Lagarta infectada com o fungo *B. bassiana*. **C.** Lagarta infectada com o fungo *M. anisopliae*. **D.** Lagarta infectada com a bactéria *B. Thuringiensis*.



**Figura 6.** Análise de sobrevivência de lagartas *B. sophorae* sob exposição a diferentes suspensões de agentes entomopatogênicos

\*As suspensões fúngicas foram ajustadas a concentração de  $1 \times 10^8$  esporos/ml, a suspensão bacteriana com *B. thuringiensis* foi aplicada na concentração recomendada para aplicação em campo e o tratamento controle foi feito com água destilada estéril

Pode-se observar a diferença entre os tratamentos quanto ao número de dias de sobrevivência (Figura 2), a suspensão com *B. thuringiensis*, apresentou mais rápido início de mortalidade efetivamente dos insetos, logo no segundo dia, porém com o passar dos dias foi diminuindo velocidade da mortalidade. Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram início de mortalidade das lagartas mais demorado aos sexto e sétimo dias, respectivamente, o que é característico de fungos, porque passam por diferentes fases como germinação, penetração, colonização e esporulação, diferentemente, da bactéria *B. thuringiensis*, que necessita apenas da ingestão e liberação da toxidade. Observou-se, que apresentaram diferença nas taxas de sobrevivência, sendo o *M. anisopliae* mais eficiente, porque provocou maior mortalidade dos indivíduos, até ultrapassando o número de indivíduos mortos por *B. thuringiensis*, no vigésimo dia após a aplicação. Já o fungo *B. bassiana*, no mesmo período conseguiu alcançar somente 50% de mortalidade dos indivíduos.

Quanto as diferentes formas de aplicação, os tratamentos não apresentaram diferenças entre si para nenhuma das duas espécies de fungos, uma vez que mesmo aplicando a suspensão diretamente sobre as lagartas ou após as colocando uma hora depois da aplicação nas folhas, a taxa de mortalidade não demonstrou diferenças.

O tempo médio de sobrevivência das lagartas após a exposição a cada tratamento com suspensão entomopatogênica foi significativamente menor ( $F = 31,7$ ;  $df = 2, 81$ ;  $p < 0,0005$ ), quando comparado ao tratamento controle com água (Figura 2). Indivíduos expostos a *M. anisopliae* morreram mais rápido do que quando exposto a *B. bassiana*, no entanto, os dias de sobrevivência para *B. thuringiensis* e *M. anisopliae* foram semelhantes, significando que o tempo de sobrevivência no tratamento controle foi significativamente maior do que nos tratamentos com as suspensões entomopatogênicas.

O fungo com maior eficiência de controle foi o fungo *M. anisopliae*, uma vez que obteve a menor taxa de sobrevivência, 5%, enquanto, *B. bassiana* apresentou taxa de 15%. O fungo *M. anisopliae* também apresentou maior tempo de ação no controle de lagartas, pois, apresentou mortalidade até o 35º dia, enquanto *B. bassiana* parou no 31º dia após a aplicação.

### **Discussão**

Este estudo demonstrou a eficácia de controle dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de lagartas de *B. sophorae* quando comparado ao tratamento já utilizados com *B. thuringiensis*, desta forma, apresentando-se como mais uma alternativa de

controle, para esta importante praga a palma de óleo. Onde o fungo mais eficiente foi o fungo do gênero *Metarhizium* UFRA M62.

O teste de viabilidade de conídios foi de extrema importância, uma vez que o processo de infecção no início do estágio de penetração do fungo na cutícula do hospedeiro permite maior sucesso no controle do inseto [15, 16].

Desta forma, embora ainda não tenha sido determinado um padrão entre o potencial de virulência e produção de conídios, sabe-se que a ação letal de isolados fúngicos, com níveis elevados de mortalidade, são diretamente proporcionais à concentração de conídios [17]. Os resultados demonstrados neste trabalho corroboram com tal afirmação, uma vez que o fungo *M. anisopliae* apresentou maior concentração e viabilidade de conídios, quando comparado com o fungo *B. bassiana*, assim como menor taxa de sobrevivência das lagartas *B. sophorae*, o que comprovou maior ação inseticida deste isolado.

Pode-se observar diferenças entre os tratamentos quanto as taxas de sobrevivência, mostrando-se que o tratamento com *B. thuringiensis*, que causou mortalidade mais rápida no início do experimento, porém com o passar dos dias foi diminuindo essa velocidade de mortalidade das lagartas, fato esse que pode ser explicado pelo processo de infecção da bactéria no organismo do indivíduo, pois dá-se após a ingestão do microorganismo, o qual, a partir da proteína Bt, que liberam toxinas, acabam formando orifícios no intestino e que levam a morte celular, septicemia e mortalidade do inseto [18]. Deste modo, caso o indivíduo não se alimente de folhas que apresenta esporos da bactéria, não será afetado.

A mortalidade ocasionada por fungos, demorou alguns dias a mais, quando comparado ao tratamento com bactéria, porém ao final, a taxa de sobrevivência das lagartas após aplicação do fungo *M. anisopliae*, foi menor que a apresentada pelo *B. thuringiensis*. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que a infecção do inseto ocorre por contato com fungo, deste modo, as lagartas não precisam alimentar-se de regiões do folíolo com o esporo, basta apenas, a locomoção pelo local aplicado, para o inseto ser contaminado. O tempo para início da mortalidade, dar-se ao fato do ciclo do fungo ser mais demorado para concretização da infecção até a morte.

A taxa de sobrevivência das lagartas quando expostas ao fungo *M. anisopliae* foi de 5% (35 dias após a aplicação da suspensão), enquanto que, quando expostas a suspensão do fungo *B. bassiana*, foi de aproximadamente 15%, e com a *B. thuringiensis* foi de 20% no mesmo período.

Tal resultado pode estar ligado ao comportamento de penetração de cada cepa de fungo ao invadir o hospedeiro [19]. Em estudo realizado por Hussain e Tian [20] com cupins, foi observado que *M. anisopliae* apresentou maior virulência no controle e maior número de estruturas penetrantes (62 – 67%), quando comparado à *B. bassiana* (43 – 52%). Desta forma, os esporos diretamente penetrantes através de apressório estarão firmemente presos a cutícula do inseto, formando maior número e rapidamente tubos germinativos.

Este mecanismo é muito importante para explicar os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que as lagartas possuem a oportunidade de obter esporos aderidos em suas partes do corpo, enquanto circulam na planta e alimentam-se dos folíolos.

A cepa de *M. anisopliae* ocasionou mais rapidamente a mortalidade das lagartas do que a cepa de *B. bassiana*, concordando com resultados de trabalhos e com objetivos semelhantes aos desenvolvidos nesta pesquisa [21-25, 20].

A aplicação residual (atópica) e não residual (tópica), não houve diferença na taxa de sobrevivência dos insetos ao final de experimento, uma vez que os esporos dos fungos ficaram viáveis, de forma latente, aguardando condições propícias para completar o ciclo no hospedeiro.

Resultados obtidos nesta pesquisa são necessários para o sucesso do método de controle, uma vez que a seleção precoce de isolados virulentos são importantes para dar condições de prosseguimento da pesquisa. Bioensaios em laboratório são fundamentais para o entendimento de parâmetros que influenciam na eficácia e persistência de patógenos em campo, para poder aplicar-se, posteriormente, ao campo.

Deve-se também levar em consideração que os estudos realizados neste trabalho foram realizados em condições de laboratório, com condições de luz, temperatura e umidade controladas. Em condições de campo, os esporos podem perder sua patogenicidade em menos tempo, uma vez que a exposição a altas temperaturas e radiação ultravioleta [26], pois podem afetar a integridade e a eficiência do fungo.

Com base nos dados obtidos nos ensaios em laboratório, mostra-se necessário o avanço nos testes em campo com os isolados em questão, uma vez que se necessita de maiores avanços em alternativas para biocontrole desta praga em palma de óleo, fortalecendo o manejo integrado de pragas e qualidade do produto ofertado na cadeia de produção da palma de óleo no Brasil.

## Referências

1. Lemos, W.P.; Lins, P. M. P.; Trevisan, O. Palmeiras. In: *Pragas agrícolas e florestais na Amazônia*. 1<sup>st</sup> ed.; Silva, N. M.; Adaime, R.; Zucchi, R. A.; Embrapa Amapá: Macapá, Brasil, 2016, 1, pp. 222-259.
2. Oliveira, T. A.; Lemos, W.P.; Tinôco, R.S.; Martins, I.C.F. *Lepidópteros Desfolhadores de Palma-de-óleo no Estado do Pará*; Embrapa Amazônia Oriental: Belém, Brasil, 2018; pp. 1-64.
3. Peña, Y.Y.C. Bioecología del gusano de la palma, *Brassolis sophorae* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), en Caracas, Venezuela. Doctoral thesis, Universidade Central da Venezuela, Caracas, 2013.
4. Genty, P. Manejo y control de las plagas de la palma aceitera en América tropical. Curso ASD para agrónomos y administradores de Palmas de Oriente, Colombia. 1989. 11p.
5. LEMOS, W. de P.; BOARI, A. J. Manejo de pragas e doenças para a cultura de palma de óleo na Amazônia. In: *Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia*; FREITAS, P. L.; TEIXEIRA, W. G., Eds.; Embrapa Solos: Rio de Janeiro, Brasil, 2010, pp. 145-152.
6. Wood, B.J.; Corley, R.H.V.; Goh, K.H. Studies on the effect of pest damage on oil palm yield. In: *Advances in oil palm cultivation*. Wastie, R. L.; Earp, D. A., Eds.; The Incorporated Society of Planters: Malásia, 1973, pp. 360-379.
7. Corley, R. H. V. Photosynthesis and productivity. In: *Oil palm research*, 1<sup>st</sup> ed.; Corley, R. H. V.; Hardon, J. J.; Wood, B. J., Eds.; Elsevier, Amsterdam, Holanda, 1976, pp. 55–76.
8. Vera, J. C. Avances preliminares sobre el establecimiento de un programa de manejo integrado de plagas em Palmas del Espino S.A. Perú. *Palmas* **2000**, 21, 227-233.
9. IBGE. Sidra: sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuário/censo-agropecuário-2017#agroindustria-rural>>. (Acessado em 10 de agosto 2019).
10. Zambiaazzi, E.U.; Scheila, R.G.; Corrassa, J.N.; Bonaldo, S.M.; Zuffo, A.M.; Soares, I.O.; Oliveira, C.S. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* no controle *in vitro* da lagarta-da-espiga do milho (*Helicoverpa zea*). *Rev. de Ciênc. Agrár.*, **2016**, 39:1, 89-94.
11. Moraes, C.P.; Foerter, L.A. Toxicidade e controle residual de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) com *Bacillus thuringiensis* Berliner e inseticidas. *Ciênc. Rural* **2012**, 42:8, 1335-1340.
12. Dickson, M. H.; Shelton, A. M.; Eigenbrode, S. D.; Vamosy, M. L.; Mora, M. Selection for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) in cabbage. *Hortscience* **1990**, 25:12, 1643-1646.
13. Perez, C.J.; Shelton, A.M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central América. *J. Econ. Entomol.* **1997**, 90:1, 87-93.
14. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
15. Bittencourt, V.R.E.P.; Mascarenhas, A.G.; Faccini, J.L.H.; 1999. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciênc. Rural* **1999**, 29, 351–354.

16. Schrank, A.; Vainstein, M.H.; *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* **2010**, *56*, 1267–1274.
17. Quinelato, S.; Golo, P.S.; Perinotto, W.M.S.; Fillipe A. Sá, F.A.; Camargo, M.G.; Angelo, I.C.; Moraes, A.M.L.; Vânia R.E.P. Bittencourt, V.R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus larvae. *Vet. Parasitol.* **2012**, *190*, 556– 565.
18. Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S.S., Soberón, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*:7, 23-31.
19. Neves, P.M.O.J.; Alves, S.B. External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Neotrop. Entomol.* **2004**, *33*, 51–56
20. Hussain, A; Tian, M. Germination Pattern and Inoculum Transfer of Entomopathogenic Fungi and their Role in Disease Resistance among *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Int. J. Agric. Biol.* **2013**, *15*:2, 319-324.
21. Singha, D.; Singha, B.; Dutta, B.K. Virulence of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on tea termite *Microcerotermes beelsoni* Snyder Barak valley of Assam. *Ind. J. Entomol.*, **2006**, *68*:1, 66–70.
22. Ahmed, S.; Ashraf, M.R.; Hussain, M.A.; Riaz, M.A. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* from Gujranwala (Pakistan) against *Coptotermes heimi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Int. J. Agric. Biol.* **2009**, *11*, 707–711.
23. Dong, C.; Zhang, J.; Huang, H.; Chen, W.; Hu, Y. Pathogenicity of new China variety of *Metarhizium anisopliae* (Manisopliae var.dcjhyium) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. *Microbiol Res* **2009**, *164*, 27–35.
24. Pik-Kheng, H., Choon-Fah, J., Bong, K.J., Amartalingam, R. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates and their effects on subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae) American. *J. Agric. Biol. Sci.* **2009**, *4*:4, 289–297
25. Singha, D.; Singha, B.; Dutta, B.K. Potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in the control of tea termite *Microtermes obesi* Holmgren in vitro and under field conditions. *J. Pest. Sci.* **2011**, *84*, 69–75.
26. Bukhari, T.; Takken, W.; Koenraadt, C.J.M. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors* **2011**, *4*:23, 1-14.

**CAPÍTULO 5. SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA MANEJO DE *Automeris liberia* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) EM ÁREA COMERCIAL DE PALMA DE ÓLEO NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**LISTA DE ABREVIATURAS****TL**

Tempo Letal

**UFRA\_Ma62**Isolado 62 de *M. anisopliae* do Laboratório de Proteção de Plantas na Universidade Federal Rural da Amazônia.**UFRA\_Bb05**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Abundância de gêneros de isolados de fungos obtidos de solo em áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil
- Figura 2** Distribuição do número de isolados de fungos obtidos nos sistemas de produção orgânico e convencional em áreas comerciais de Palma de óleo, Amazônia Oriental, Brasil. Letras diferentes indicam diferenças entre médias (Tukey,  $P < 0,05$ ), e as barras o desvio padrão.
- Figura 3** Tempo letal de 50% (TL50) de mortalidade da população de larvas de *Tenebrio molitor* expostos as concentrações  $10^6$ ;  $10^7$ ;  $10^8$ ;  $10^9$  conídios/ml de suspensões de *Beauveria bassiana* (UFRA\_Bb02; UFRA\_Bb05; UFRA\_Bb06; UFRA\_Bb10) e tratamento controle (água), em laboratório. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste fatorial simples ( $P < 0,05$ ).
- Figura 4** Tempo letal de 50% (TL50) de mortalidade da população de larvas de *Tenebrio molitor* expostos as concentrações  $10^6$ ;  $10^7$ ;  $10^8$ ;  $10^9$  conídios/ml de suspensões de *Metarhizium anisopliae* (UFRA Ma04; UFRA Ma05; UFRA Ma11; UFRA Ma62; UFRA Ma101) e tratamento controle (água), em laboratório. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste fatorial simples ( $P < 0,05$ ).
- Figura 5** Mortalidade de *Automeris liberia* em área comercial de palma de óleo,

após a aplicação de fungos entomopatogênicos. Letras diferentes indicam diferença entre médias (Tukey,  $P < 0,05$ ), as barras representam o desvio padrão.

**Figura 6**

Árvore filogenética baseada em sequências da região ITS, alinhadas pelo sistema CIPRES pela análise de Máxima Verossimilhança de isolados de *Beauveria bassiana* (UFRA\_Bb01; UFRA\_Bb02; UFRA\_Bb05; UFRA\_Bb10). Espécies destacadas em negrito referem-se aos isolados tipo e destacados em azul são isolados obtidos a partir de áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil.

**Figura 7**

Árvore filogenética baseada em sequências da região ITS alinhadas pelo sistema CIPRES pela análise de Máxima Verossimilhança dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (UFRA\_Ma04; UFRA\_Ma05; UFRA\_Ma11; UFRA\_Ma62; UFRA\_Ma101). Espécies destacadas em negrito referem-se aos isolados tipo e destacados em verde são os isolados obtidos a partir de áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil.

**Figura 8**

Relação custo x eficiência de controle com suspensões entomopatogênicas a base de *B. thuringiensis*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* além do tratamento controle com água.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Custos de aplicação de formulados entomopatogênicos no controle do desfolhador *Automeris liberia* em plantios comerciais de Palma de óleo (R\$/ha). Amazônia Oriental, Brasil
- Tabela 2** Sequências de bases para identificação molecular de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, utilizados para o controle do desfolhador *A. liberia* em plantios comerciais de Palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil
- Tabela 3** Espécies de fungos entomopatogênicos nativos de áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil

**Seleção de fungos entomopatogênicos e economicidade no manejo de *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae) em área comercial de palma de óleo na Amazônia Oriental**

**\*O artigo será submetido a revista *Journal of Economic Entomology***

**Resumo**

A lagarta desfolhadora *Automeris liberia* é uma praga de grande importância econômica em várias culturas, apresentando-se como destaque em Palma de óleo na Amazônia. Objetivou-se selecionar isolados entomopatogênicos e avaliar a porcentagem de mortalidade, eficiência de controle e potencial econômico deste método no manejo de *A. liberia*. Foram selecionadas cepas dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, nativos da Amazônia oriental, comparando-as com o tratamento convencional a base de *Bacillus thuringiensis*. Os melhores isolados, previamente escolhidas via *screening* toxicológico em laboratório, foram UFRA\_Ma62 e UFRA\_Bb05, obtidas de solos de plantios comerciais orgânicos de palma de óleo. Nas análises estatísticas foram realizadas teste Tukey ( $p < 0,05$ ) e análise fatorial simples com o programa R. Os resultados demonstraram que o tratamento com o isolado nativo *M. anisopliae* UFRA\_Ma62, promoveu maiores mortalidade, eficiência de controle e economicidade, em relação ao tratamento com *B. thuringiensis* utilizado tradicionalmente na área.

Palavras-chave: Controle biológico, custo-benefício, eficiência de controle, potencial econômico

**Abstract**

The defoliating caterpillar *Automeris liberia* is a pest of great economic importance in several cultures, presenting itself as a highlight in oil palm in the Amazon. The objective was to select entomopathogenic isolates and evaluate the percentage of mortality, efficiency of control and economic potential of this method in the management of *A. liberia*. Strains of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, native to the eastern Amazon, were selected and compared with the conventional treatment based on *Bacillus thuringiensis*. The best isolates, previously chosen via toxicological screening in the laboratory, were UFRA\_Ma62 and UFRA\_Bb05, obtained from soils from commercial organic oil palm plantations. In the statistical analyzes, Tukey test ( $p < 0.05$ ) and simple factor analysis with the R program. The results demonstrated that the treatment with the native isolate *M. anisopliae* UFRA\_Ma62, promoted higher mortality, control efficiency and economy, in relation to the treatment with *B. thuringiensis* traditionally used in the area.

Keywords: Biological control, cost benefit, control efficiency, economic potential

## Introdução

Popularmente conhecida como “mariposa alvo”, a espécie *Automeris liberia* Cramer é composta de mariposas da família Saturniidae, subfamília Hemileucinae.

De acordo com (Specht et al., 2006), o gênero *Automeris* tem 135 espécies e muitas variações de tamanho. São caracterizadas por grande mancha preta ou vermelha arredondada que se assemelha a um olho na asa posterior. Outra característica é o erucismo das lagartas, quando em contato com a pele humana, podem causar queimaduras graves. A lagarta é voraz desfolhadora, com ocorrência em vários países das Américas Central e do Sul (Cock, 2005).

Alguns levantamentos fitossanitários, foram encontradas lagartas do gênero *Automeris* causando sérios danos em diferentes espécies vegetais, como: banana, abacate, algodoeiro, cafeeiro, eucalipto, mangueira, citrus etc., nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil (Zanuncio et al., 1992) e também registrado em plantas de eucalipto (Specht et al., 2006, 2007). Na Amazônia Oriental, Norte do Brasil, foi registrado ocorrência em plantas da família Areacaceae (Silva et al., 2019), relataram ataques de *Automeris liberia* em plantios comerciais de palma de óleo.

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma espécie da família arecaceae de origem africana, cultivada em regiões tropicais úmidas da África, Ásia e América, e, segundo Wahid et al. (2004), representa a mais importante fonte de óleo vegetal para o consumo humano. May (2012) mostrou que mais de 80% é destinada para indústria de alimentos e, segundo Brandão e Schoneveld (2015), o estado do Pará, Brasil, apresenta área plantada de aproximadamente 250.000 ha, que corresponde por 86,44% da produção brasileira, com alta geração de emprego e renda as comunidades locais.

As lagartas de *A. liberia* causam grandes prejuízos a Palma de óleo na sua forma larval, as quais provocam desfolhamentos, implicando na diminuição da área foliar, o que

provavelmente refletirá diretamente na diminuição da produção de foto assimilados e conseqüentemente ocasionando a diminuição da produção de óleo.

A utilização de fungos entomopatogênicos no manejo de pragas, apresenta segurança e seletividade (Goettel e Johnson, 1992; Ekesi et al., 1999). Porém, o sucesso dos patógenos no controle de insetos pragas depende em grande parte da seleção destes, desta forma, testes de campo são importantes para comprovar a eficácia de produtos à base de fungos entomopatogênicos, pois a virulência pode variar entre espécies de fungos e espécies hospedeiras (Poprawski et al., 1985; Feng e Johnson, 1990; Maniania, 1992).

Visando proporcionar novas alternativas biológicas de controle a desfolhadores e subsidiar informações econômicas para ações de manejo que visem minimizar os danos causados a cultura da palma de óleo, objetivou-se selecionar isolados entomopatogênicos, avaliar mortalidade, eficiência de controle e potencial econômico deste método no manejo de *A. liberia* em áreas comerciais de palma de óleo na Amazônia Oriental.

## **Metodologia**

### **Coleta dos isolados e *screening* toxicológico**

Os isolados dos fungos selecionados foram provenientes de amostras compostas, coletados de solos de áreas comerciais de sistemas de plantio orgânico e convencional de palma de óleo, pertencentes a empresa Agropalma S/A, na Amazônia Brasileira, situada a 2 ° 31'33.9 "S 48 ° 45'49.1" W, pois acredita-se que cepas geograficamente regionais e adaptadas as condições edafoclimáticas da área nativa, sejam mais eficientes para o controle biológico de pragas, nas áreas de origem. Foram obtidos 238 isolados. E a partir do *screening* toxicológico feito através de aplicação de  $1 \times 10^8$  esporos viáveis/ml, sobre larvas de 3° instar

de *Tenebrio molitor*, foram selecionados nove isolados os quais causaram as maiores mortalidades. Destes, outro bioensaio foi realizado com diferentes concentrações ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios/ml), dos quais selecionou-se dois isolados e utilizados neste trabalho, UFRA\_Ma62 (*M. anisopliae*) e UFRA\_Bb05 (*B. bassiana*), devidos os quais apresentarem maior virulência em menor tempo. Nos ensaios de seleção dos isolados, foram utilizadas 10 larvas de *T. molitor*/repetição e 4 repetições/tratamento.

### **Aplicação dos isolados em campo**

No campo o delineamento experimental foi realizado inteiramente ao acaso, sendo selecionadas 28 plantas que tivessem o padrão de tomada de decisão da empresa, média de 9 lagartas na folha 19. As plantas apresentavam lagartas de 3° e 4° instares, as quais apresentavam baixa mobilidade, sendo utilizadas 7 plantas/tratamento, sendo: T0 = Água, T1=*M. anisopliae*, T2=*B. bassiana*, e T3= Controle padrão da empresa, a base de *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Produto comercial Thuricidae).

Como metodologia de aplicação foi utilizado o padrão da empresa, 8 kg de produto/10 ha, diluídos em 2.000 litros de água, para todos os tratamentos.

As suspensões foram aplicadas a cada planta, pela manhã, até ao ponto de escorrimento. A avaliação de mortalidade deu-se no sétimo dia após aplicação do tratamento, contabilizando-se o número de lagartas vivas presentes nas plantas.

Para a análise da eficiência de controle das lagartas pelos produtos, utilizou-se a fórmula de Abbott (1925):

$$C\% = 1 - \left( \frac{N^\circ \text{ de insetos tratados com bioinseticida após tratamento}}{N^\circ \text{ de insetos do tratamento controle após tratamento}} \right) * 100$$

### Potencial econômico

Para análise do custo de aplicação dos fungos entomopatogênicos, usou-se como base a pesquisa de Tinoco (2016), o qual levou-se em consideração o custo de mão de obra para a aplicação, mecanização e valor do produto por hectare aplicado (Tabela 1).

Após o cálculo da eficiência de cada produto utilizado e os custos das aplicações pode-se avaliar a melhor medida de controle, que poderá ser incorporado num programa de manejo integrado da lagarta desfolhadora *A. liberia* em palma de óleo.

**Tabela 2.** Custos de aplicação de formulados entomopatogênicos no controle do desfolhador *Automeris liberia* em plantios comerciais de Palma de óleo (R\$/ha). Amazônia Oriental, Brasil

	<i>B. thuringiensis</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	Água
- Custo de 800g do Produto	120,00	64,00	64,00	-
- Mão de obra (1 Pessoa)	2,84	2,84	2,84	2,84
- Mecanização (Trator + Atomizador)	2,98	2,98	2,98	2,98
<b>TOTAL</b>	125,82	69,82	69,82	5,82

### Identificação molecular dos isolados

Após a extração do DNA, a partir de cultura monospórica os nove isolados selecionados na segunda fase da pesquisa foram identificados pela metodologia molecular conhecida como

touchdown PCR (Don et al., 1991). Foram utilizadas as sequências de bases de ITS1 para *B. bassiana* e ITS4 para *M. anisopliae* (Tabela 2).

As amplificações dos DNAs foram com desnaturação por 2 minutos a 94°C. Temperatura de anelamento no primeiro ciclo de amplificação a 66°C, o qual foi subsequentemente de forma incremental em 1°C por ciclo durante os próximos 9 ciclos. Foram realizados 36 ciclos de amplificação, com desnaturação de 30 segundos a 94°C, e anelamento de 30 segundos a 56°C e extensão de 1 min a 72 ° C e incubação de 10 minutos a 72°C (Rehner e Buckley, 2005).

As amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger (1977), na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Das sequências, foram feitas a identificação dos isolados pelo método da Verossimilhança e posteriormente depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information), os números de acessos encontram-se na Tabela 3.

As relações filogenéticas e a obtenção das árvores foram estimadas pelo método de máxima verossimilhança, o qual permite calcular estimativas de menor variância e menos erros de amostragem (Felsenstein, 1981).

**Tabela 3:** Sequências de bases para identificação molecular de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, utilizados para o controle do desfolhador *A. liberia* em plantios comerciais de Palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil

Isolados	Sequências de bases	Referências
UFRA_Bb05	ITS1: 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White et al. (1990)
UFRA_Ma62	ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Rehner e Buckley (2005)

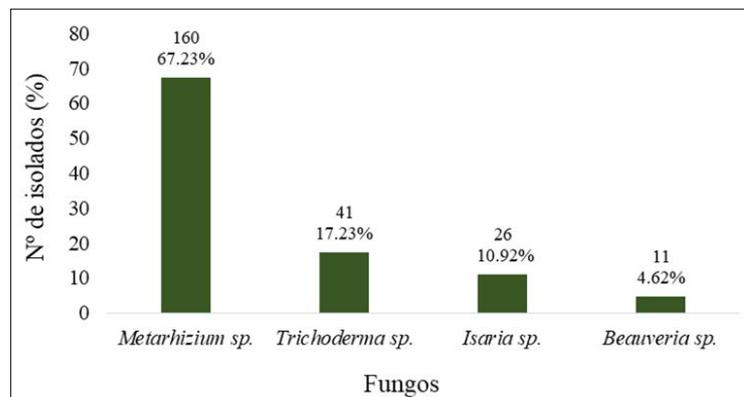
## Análise estatística

As mortalidades de *T. molitor* para seleção dos isolados no screening toxicológico e do controle de *A. liberia* em campo foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, ambos no programa R (versão 3.1.2 para Windows). Para o cálculo das mortalidades corrigidas e eficiência de controle utilizou-se a fórmula de Abbott (1925).

## Resultados

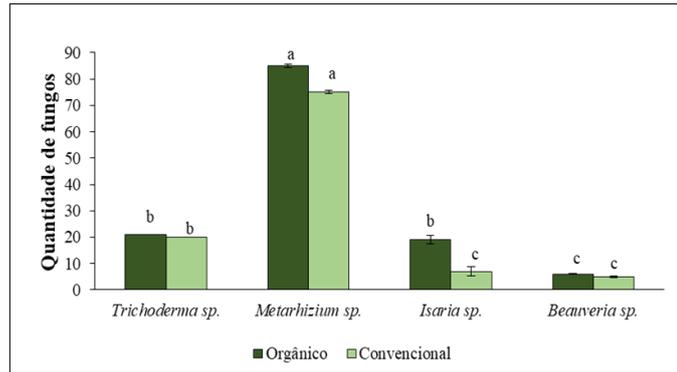
### Coleta e seleção dos isolados

Foram coletados 238 isolados de fungos pertencentes aos gêneros *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium* e *Trichoderma* (Figura 1).



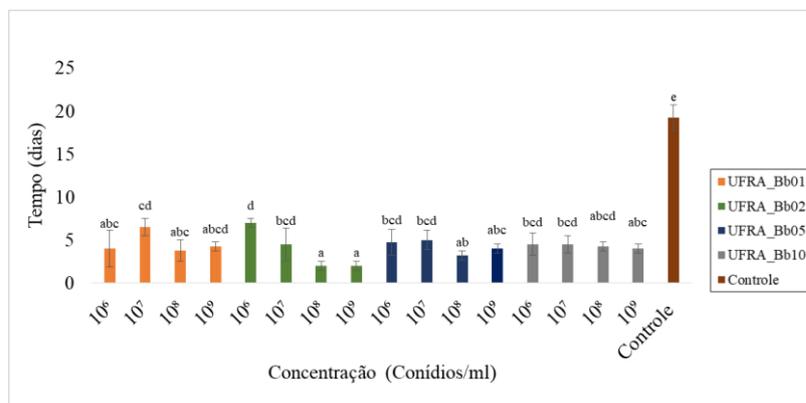
**Figura 7.** Abundância de gêneros de isolados de fungos obtidos de solo em áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil

O maior número de isolados, cerca de 55% foram obtidos de áreas comerciais de plantios orgânicos de palma de óleo, entretanto, o número de isolados não diferiu entre as áreas, exceto para o gênero *Isaria* (Figura 2).

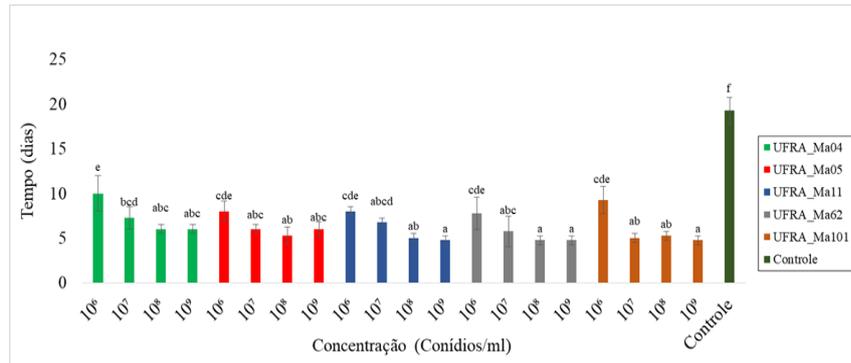


**Figura 8.** Distribuição do número de isolados de fungos obtidos nos sistemas de produção orgânico e convencional em áreas comerciais de Palma de óleo, Amazônia Oriental, Brasil. Letras diferentes indicam diferenças entre médias (Tukey,  $P < 0,05$ ), e as barras o desvio padrão.

O bioensaio com os 9 isolados resultantes do *screening* toxicológico, resultaram nos dois isolados para aplicação no campo, os quais foram UFRA\_Bb05 e UFRA\_Ma62, após a análise fatorial simples do tempo letal de 50% dos insetos sob diferentes concentrações de cada isolado (Figuras 3 e 4).



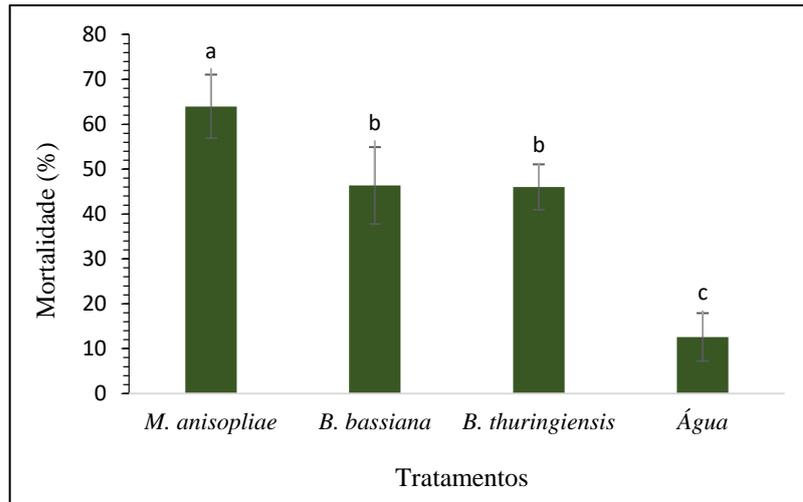
**Figura 9.** Tempo letal de 50% (TL50) de mortalidade da população de larvas de *Tenebrio molitor* expostas as concentrações  $10^6$ ;  $10^7$ ;  $10^8$ ;  $10^9$  conídios/ml de suspensões de *Beauveria bassiana* (UFRA\_Bb02; UFRA\_Bb05; UFRA\_Bb06; UFRA\_Bb10) e tratamento controle (água), em laboratório. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste fatorial simples ( $P < 0,05$ ).



**Figura 10.** Tempo letal de 50% (TL50) de mortalidade da população de larvas de *Tenebrio molitor* expostos as concentrações 10<sup>6</sup>; 10<sup>7</sup>; 10<sup>8</sup>; 10<sup>9</sup> conídios/ml de suspensões de *Metarhizium anisopliae* (UFRA Ma04; UFRA Ma05; UFRA Ma11; UFRA Ma62; UFRA Ma101) e tratamento controle (água), em laboratório. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste unifatorial (P<0,05).

### Controle de *Automeris liberia* em campo

O isolado de *M. anisopliae* UFRA\_Ma62 em campo, foi o que causou maior controle de *A. liberia*, (Figura 5), ocasionando mortalidade de 64 % da população inicial presente nas plantas, diferenciando dos tratamentos com o isolado de *B. bassina* e o tratamento convencional a base de *B. thuringiensis*, os quais não apresentaram diferença entre si, com valores de mortalidade de 46%, porém todos apresentaram diferença quando comparados ao tratamento controle com água, que foi de apenas 12,60%.



**Figura 5.** Mortalidade de *Automeris liberia* em área comercial de palma de óleo, após a aplicação de fungos entomopatogênicos. Letras diferentes indicam diferença entre médias (Tukey,  $P < 0,05$ ), as barras representam o desvio padrão.

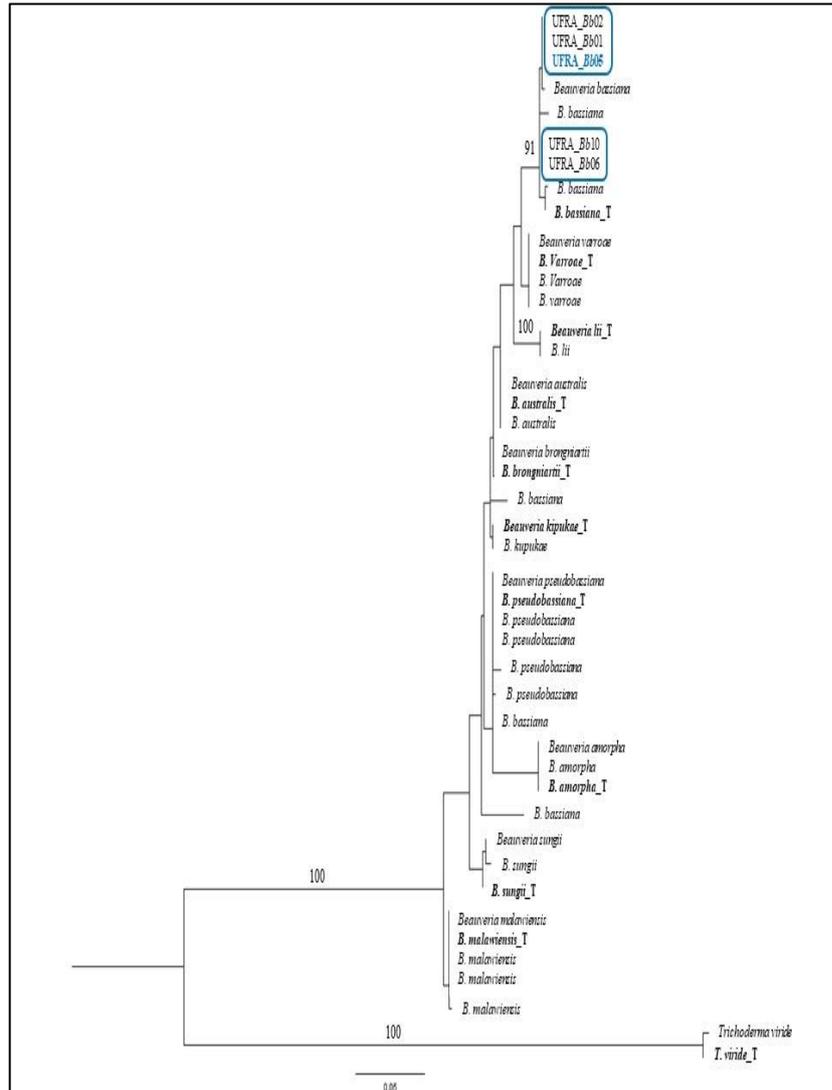
### Identificação molecular dos isolados

Os nove isolados selecionados como os melhores em laboratório, incluindo os dois avaliados em campo, distribuíram-se na identificação molecular em 2 grupos, sendo 4 isolados de *B. bassiana* e 5 isolados de *M. anisopliae* (Tabela 3) e respectivos números de acessos ao banco de dados genético do NCBI (National Center for Biotechnology Information), estão disponíveis na Tabela 3.

**Tabela 4.** Espécies de fungos entomopatogênicos nativos de áreas comerciais de palma de óleo. Amazônia Oriental, Brasil

Espécie	Código Coleção LPP	Hospedeiro	Origem	Sistema de produção	Acesso GenBank
<i>B. bassiana</i>	UFRA_Bb02	Solo	Brasil	Orgânico	MN947543
<i>B. bassiana</i>	UFRA_Bb05	Solo	Brasil	Orgânico	MN947544
<i>B. bassiana</i>	UFRA_Bb06	Solo	Brasil	Orgânico	MN947545
<i>B. bassiana</i>	UFRA_Bb10	Solo	Brasil	Convencional	MN947546
<i>M. anisopliae</i>	UFRA_Ma04	Solo	Brasil	Orgânico	MT476881
<i>M. anisopliae</i>	UFRA_Ma05	Solo	Brasil	Orgânico	MT476882
<i>M. anisopliae</i>	UFRA_Ma11	Solo	Brasil	Orgânico	MT476883
<i>M. anisopliae</i>	UFRA_Ma62	Solo	Brasil	Orgânico	MT476884
<i>M. anisopliae</i>	UFRA_Ma101	Solo	Brasil	Convencional	MT476885

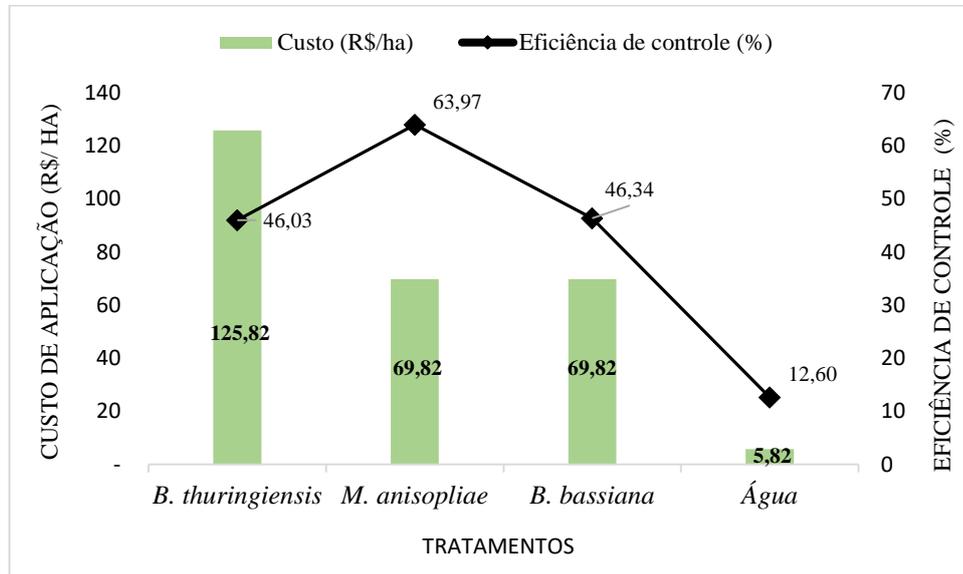
A partir do sequenciamento genético, pode-se analisar pelo método de Máxima Verossimilhança que os isolados avaliados neste trabalho, pertencem as espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae*, como mostrados nas respectivas árvores filogenéticas (Figuras 6 e 7), ambos com mais de 90% de confiabilidade.



**Figura 6.** Árvore filogenética baseada em sequências da região ITS, alinhadas pelo sistema CIPRES pela análise de Máxima Verossimilhança de isolados de *Beauveria bassiana* (UFRA\_Bb01; UFRA\_Bb02; UFRA\_Bb05; UFRA\_Bb10). Espécies destacadas em negrito referem-se aos isolados tipo e destacadas em azul são isolados obtidos a partir de áreas comerciais de palma de óleo, Amazônia Oriental, Brasil.



de *B. bassiana* que se apresentaram semelhantes com 42% e do tratamento controle com água, com somente 11,98%.



**Figura 8.** Relação custo x eficiência de controle com suspensões entomopatogênicas a base de *B. thuringiensis*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* além do tratamento controle com água.

### Potencial econômico

O custo de utilização do controle padrão com *B. thuringiensis* em comparação com os fungos entomopatogênicos foi maior. Observou-se que a aplicação com o uso dos isolados foi de R\$ 69,82/ha, enquanto, que com *B. thuringiensis* foi de R\$ 125,82/ha.

### Discussão

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que a maioria dos isolados foram provenientes de solos com plantio orgânico de palma de óleo. Resultado esperado, uma vez que a microbiota nesses ambientes é mais preservada e mais abundante, devido ao não uso de agrotóxicos. Pois, conforme Rosseló-Mora e Amann (2001), um grama de substrato pode

conter 10 bilhões de microrganismos, divididos em milhares de espécies. Tais microrganismos participam diretamente dos ciclos dos nutrientes no solo, catalizando a ciclagem dos nutrientes e da matéria orgânica, fatores influentes na fertilidade natural do ambiente em questão e, conseqüentemente, na produtividade do ecossistema.

Também, entre os microrganismos presentes na microbiota do solo, encontram-se os fungos entomopatogênicos. Sendo o solo ambiente importante como reservatório natural dos microrganismos, e muitas espécies são encontradas em solos cultivados em todo o mundo (Sun et al., 2008), sendo que várias espécies têm potencial para controlar naturalmente insetos-praga de áreas agrícolas, caso recorrente na área estudada onde o fungo *B. bassiana* foi observado infectando lagartas de *Brassolis sophorae*, porém com baixa frequência.

Muitas interações ocorrem entre a microbiota nativa do solo, incluindo os fungos entomopatogênicos, como relações de sinergismo, antagonismo, mutualismo etc. A habilidade de proliferar e manter a virulência quando cultivados no habitat nativo é altamente desejável (Ignoffo, 1992), desta forma, o isolamento dos fungos nativos da área, foi para provarmos que a adaptação e utilização dos mesmos seriam melhores em seu habitat de origem, por provavelmente estarem adaptados com as condições edafoclimáticas da área, o que pode ser observado com os resultados de melhor eficiência com os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em relação ao *B. thuringiensis*, tradicionalmente utilizado na área de estudo.

As classificações filogenéticas baseadas na análise de DNA ajudaram a melhorar a compreensão das relações fúngicas (Shahid et al. 2012). Nesta pesquisa pode-se confirmar através de análise filogenética que as espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae* são importantes para o manejo de *A. liberia* em palma de óleo.

A escolha das regiões sequenciadas foi baseada nos trabalhos de White et al., (1990) e Rehner e Buckley (2005), os quais utilizaram a região ITS (Internal Transcribed Spacer), o

que proporcionou o conhecimento de 600 a 800 pares de bases com a utilização de primers universais (Fungaro, 2000).

A identificação taxonômica dos isolados utilizados tem grande importância (Dolinsky, 2007; Stockinger et al. 2010), pois no manejo integrado de pragas se faz necessário se saber a espécie exata do microrganismo, local geográfico de coleta e eficiência em campo sob todas as condições climáticas.

Para os estudos de campo, precisou-se levar em consideração a disponibilidade de populações naturais de *A. liberia* na área, uma vez que sua maior incidência ocorre na época chuvosa da região Amazônica. Desta forma no período da aplicação dos bioensaios houve alta pluviosidade na região (402mm.m<sup>2</sup>) e baixa temperatura (23-28°C), enquanto, que no período seco o índice pluviométrico chega até 49 mm.m<sup>2</sup> e temperatura entre 23-34°C, o que pode ter interferido nos resultados de controle que poderiam ser sido maiores, pois no período chuvoso as folhas com os tratamentos são lavadas, ficando pouco inóculo para entrar em contato com a praga. Logo, as condições ambientais podem interferir no ciclo de vida do inseto, assim como o índice pluviométrico no período de avaliação (Genty et al., 1986).

Entretanto, o bioensaio de campo serviu para comprovar a eficiência dos isolados, que já tinham sido previamente avaliados em laboratório e com resultados satisfatórios. O isolado UFRA\_Ma62 *M. anisopliae* foi o que apresentou maior porcentagem de mortalidade das lagartas de *A. liberia*, com 64%, quando comparado com UFRA\_Bb05 de *B. bassiana* e o *B. thuringiensis* (Produto comercial) que apresentou 46%. Acredita-se que provavelmente a menor mortalidade causada por *B. thuringiensis*, seja devido o produto ser utilizado na área por muitos anos, o que pode ocasionar decréscimo da eficiência, muito provável a espécie já esteja criando resistência ao mesmo.

Em testes de controle do besouro *Rhynchophorus ferrugineus* muito presente em palma de óleo, Fite et al. (2019) e Rahman e Raheem (2018) encontraram também a maior eficiência de controle quando o inseto foi exposto a cepas de *M. anisopliae*, quando comparado a cepas de *B. bassiana* e *B. thuringiensis*, porém em laboratório.

O isolado de UFRA\_Bb05 de *B. bassiana* ocasionou mortalidade menor do que as obtidas em laboratório. Muito provavelmente relacionado ao fato de que a eficiência mediana do isolado de *B. bassiana* em campo, pode ter relação com a perda da atividade da suspensão aquosa de conídios do fungo (Bata, 2007; Davari et al., 2015). Por outro lado, tem sido frequentemente confirmado que a temperatura e umidade relativa em condições de campo afetam a eficácia de conídios não formulados de *B. bassiana* (Luz et al., 1998; Luz e Fargues, 1999; Haraprasad et al., 2001; Lecuona et al. 2001), como foi o caso nesta pesquisa.

Ao contrário de outros agentes potenciais de biocontrole, como o *B. thuringiensis*, os fungos entomopatogênicos não precisam ser ingeridos para infectar seus hospedeiros, pois invadem diretamente através da cutícula para que possam ser efetivamente usados para o controle de todos os insetos (Sujeetha e Sahayaraj, 2014), além disso, os fungos entomopatogênicos, invadem as aberturas naturais dos insetos, como boca, poros, espiráculos, ânus, etc, o que favorece infecções mais severas e rápidas. Deste modo, estes mecanismos de ação podem proporcionar vantagem do uso de fungos no controle de insetos, quando comparados com bactérias.

Outra vantagem da utilização dos fungos em biocontrole, é que o início da epizootia artificial tem sido realizado para controle a longo prazo, especialmente em áreas onde prevalecem as condições de alta umidade. Assim, basta apenas uma lagarta morta na superfície da planta, que constitui foco importante de infecção quando o fungo esporular e, portanto, servir como fonte de inóculo para infectar outros insetos saudáveis (Ekesi et al., 2008) como também disseminar os esporos sobre a folhagem da planta hospedeira.

Quanto a utilização dos fungos entomopatogênicos, Shaid et al., (2012), ressaltaram que os requisitos de produção, para biopatógenos, incluem custo razoável, estabilidade a longo prazo e, o mais importante, eficiência consistente em condições de campo. Nesta pesquisa, esses requisitos foram cumpridos quando analisados a porcentagem de eficiência de controle, mortalidade de lagartas e custo de aplicação dos isolados, principalmente, para *M. anisopliae*, quando comparados com o controle convencional com *B. thuringiensis*.

Destaca-se que o isolado de *M. anisopliae*, apresentou eficiência de controle de 62,01%, sendo 50,03% maior que a apresentada pelo tratamento controle (11,98%) e 20% a mais que o tratamento padrão com *B. thuringiensis* e o com *B. bassiana*, que obtiveram 42% de eficiência e 30 % mais eficazes quando comparados ao tratamento controle. Vale ressaltar que esses resultados foram obtidos em períodos muito chuvosos, ou seja, com condições climáticas desfavoráveis (Genty et al., 1986) para a permanência dos microrganismos sobre a planta.

A massa de produto utilizada para todos os tratamentos foi a mesma, 800 g de produto, mantendo-se os mesmos padrões do tratamento convencional utilizado na área de estudo, porém os três produtos apresentaram concentrações diferentes, como:  $0,8 - 1,3 \times 10^8$ ,  $0,9 - 1,9 \times 10^8$  e  $30 - 52 \times 10^9$  conídios/ml, respectivamente, para UFRA\_Bb05 *B. bassiana*, UFRA\_Ma62 *M. anisopliae* e *B. thuringiensis*. Desta forma, comprovou-se a eficiência dos fungos entopatógenos utilizados na pesquisa, uma vez que com menores concentrações alcançaram mortalidades e eficiência iguais, como no caso da *B. bassiana* e maior com o uso do *M. anisopliae*, em relação ao produto comercial já tradicionalmente utilizado na área.

Os custos com as aplicações demonstraram o potencial econômico da utilização do isolado UFRA\_Ma62 na economicidade de controle de *A. liberia*, pois foram gastos R\$ 125,82/ha na aplicação de *B. thuringiensis*, com apenas 46% de mortalidade e 42% de eficiência de controle sobre as lagartas, não diferindo do tratamento com *B. bassiana*,

entretanto, a aplicação com UFRA\_Ma62 de *M. anisopliae* foi R\$ 69,82/ha, diminuindo os custos por ha em R\$ 56,00, o que equivaleu economicidade de 44%/ha, além de ter promovido mortalidades e eficiência de controle acima de 60%, pois para controle biológico em campo, esse percentual é altamente vantajoso. Comprovando que o uso do controle biológico com isolados da biodiversidade nativa da área, favoreceu a proteção das plantas contra o desfolhador e auxiliou na produção racional da cultura da palma de óleo na Amazônia, com sustentabilidade e preservação a natureza.

Além disso, o controle biológico com microrganismos contribuem com o meio ambiente, nos custos de produção a curto prazo, e sustentável ao longo prazo, devido a maximização da qualidade do solo e o aumento da microbiota local, ajuda na redução de adição de metais pesados, que ficam no solo pelo uso constante dos químicos, além disso, o não uso ou a redução do uso de agrotóxicos, diminuem a contaminação dos aplicadores, animais, consumidores finais, solo, polinizadores, bacias hidrográficas, lençóis freáticos e dos mananciais de água, que são áreas altamente fragilizadas na Amazônia brasileira.

Ressalta-se que o uso de controle biológico vem crescendo em ritmo acelerado em vários sistemas de plantios, com previsão de movimentar mais de US\$ 5 bilhões em 2020, salto equivalente a US\$ 2 bilhões com relação ao ano anterior, crescimento na ordem de 10% ao ano em outros países e no Brasil mais de 15%. O controle biológico não deve mais ser visto simplesmente como o combate aos insetos por meio da introdução de inimigos naturais, como os microorganismos, hoje essa tendência está intimamente associada à inovação, uma vez que abrange tecnologias modernas (ABCbio, 2020) de uso sustentável como os microrganismos cada vez mais potentes para o controle de pragas.

## Referências Citadas

- Abbott, WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- (ABCbio) Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. Brasil se destaca no mercado de controle biológico. 2019. ABCbio, São Paulo, Brasil.
- Batta, YA. 2007. Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdale* Geurin Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Appl. Microbiol.* 103: 1406-141.
- Cock, MJW. 2005. *Automeris liberia* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) in Trinidad. *Living World Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club.* 48-49.
- Da Silva, KB, CB da Silva, KAL Ribeiro Junior, JMD. de Freitas, JD de Freitas, GS Chia, RS Tinoco, JG da Costa, HF Goulart, and AEG Santana. 2019. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae). *Micron.*
- Davari, B, M Limoe, S Khodavaisy, G Zamini, and S Izadi. 2015. Toxicity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium muscarium* against a field-collected strain of the German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Trop. Biomed.* 32: 463–470.
- Don RH, PT Cox, BJ Wainwright, K Baker, JS Mattick. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids. Res.* 19:4008.
- Dolinsky, LCB. 2007. As Diversas aplicações da genética molecular no século XXI: uma nova era nas ciências biológicas. *Saúde Ambiente Rev.* 2: 21-25.

- Ekesi, S, NK Maniania, K Ampong-Nyarko, and I Onu. 1999. Effect of intercropping cowpea with maize on the performance of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against the legume flower thrips, *Megalurothrips sjostedti* and some predators. Environ. Entomol. 28: 1154-1161.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17(6): 368-376.
- Feng, MG, and JB Johnson. 1990. Relative susceptibility of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. 19: 785-790.
- Fungaro, MHP. 2000. PCR na Micologia. Biotecnologia cienc. desenvolv.. 14: 12-16.
- Genty, P, A Garzon, F. Lucchini and C Delvare. 1986. Polinización entomófila de la palma africana en América tropical. Oléagineux. 41: 99-112.
- Goettel, MS and DL Johnson. 1992. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents, pp. 356-361. In: Lomer, CJ and C Prior. (Eds.), Biological Control of Locust and Grasshoppers. CABI, Wallingford, UK.
- Haraprasad, N, SR Niranjana, HS Prakash, HS Shetty and S Wahab. 2001. *Beauveria bassiana* - a potential mycopesticide for the efficient control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. Biocontrol. Sci. Techn. 11: 251-256.
- Luz, C and J Fargues. 1999. Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. Mycopathologia. 146: 33-41.
- Luz, C, MS Tigano, IG Silva, CM Cordeiro and SM Aljanabi. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. Memorial Instituto Oswaldo Cruz. 93: 8.

- Maniania, NK. 1992. Pathogenicity of entomogenous fungi (Hyphomycetes) to larvae of stemborers, *Chilo partellus* (Swinhoe) and *Busseola fusca* Fuller. Int. J. Trop. Insect. Sci. 13: 691-696.
- May, CY. 2012. Oil palm: a versatile ingredient for food and non-food applications. [http://mpoc.org.my/upload/POTS\\_INDIA2012\\_DatukDrChoo.pdf](http://mpoc.org.my/upload/POTS_INDIA2012_DatukDrChoo.pdf).
- Moura, JIL, FJ Cividanes, LP Santos Filho and RR Valle. 2008. Polinização do dendezeiro por besouros no Sul da Bahia. Pesqui. Agropecu. Bras. 43: 289-294.
- Poprawski, TJ, M Marchai and PH Roberts. 1985. Comparative susceptibility of *Otiorrhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early instar stages to five entomopathogenic hyphomycetes. Environ. Entomol. 14: 247-253.
- Püntener W. 1981. Manual for field trials in plant protection. Second edition. Ciba-Geigy Limited, Brasília, SWI.
- Rehner, SA, and E Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia. 97: 84-98.
- Sanger F, S Nicklen, AR Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 74(12): 5463-5467.
- Shahid, AA, AQ Rao, A Bakhsh and T Husnain. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. Arch. of Biol. Sci. 64: 21-42.
- Specht, A, AC Formentini and E Corseuil. 2006. Biologia de *Automeris illustris* (Walker) (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). Rev. Bras. Zool. 23: 537-546.

- Specht, A, AC Formentini and E Corseuil. 2007. Biologia e aspectos morfológicos dos estágios imaturos de *Automeris naranja* Schaus (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). Rev. Bras. Zool. 24: 523-534.
- Stockinger, H, M Krüger and A Schüßler. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist. 187: 461-474.
- Sujeetha, JARP and K Sahayaraj. 2014. pp. 31- 46. Role of entomopathogenic fungus in pest management. In: Sahayaraj K. (ed.), Basic and Applied Aspects of Biopesticides. Springer, Nova Deli, Índia.
- Sun, J, L Smith, A Armento and WM Deng. 2008. Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling. J. Cell Biol. 182: 885-896.
- Syed, RA. 1979. Studies on oil palm pollination by insects. Bull. Entomol. Res. 69:213-224.
- Syed, RA, IH Law and RHV Corley. 1982. Insect pollination of oil palm: introduction, establishment and pollinating efficiency of *Elaeidobius kamerunicus* in Malaysia. Planter. 58: 547-561.
- Tinôco, RS. 2016. Determinação do nível de dano econômico para *Opsiphanes invirae* Hübner, 1808 (Lepidoptera: Nymphalidae) em palma de óleo. Tese de doutorado. Universidade do Estado de São Paulo. São Paulo.
- Wahid, MB, SNA Abdullah and IE Henson. 2004. Oil Palm - Achievements and Potential. Plant Prod. Sci. 8: 288-297.
- White, TJ, TD Bruns and JW Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322. In: Innis, M A (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, USA.

Zanuncio, JC, M Fagundes, MSS Araújo and FC Evaristo. 1992. Monitoramento de lepidópteros, associados a plantios de eucalipto na região de Açailândia (Maranhão), no período de agosto/90 a julho/91. *Acta Amazonica*. 22: 615- 622.