



Pragas de Cana-de-açúcar X métodos alternativos de controle

Manejo de pragas de cana-de-açúcar, monitoramento, controle biológico e transgenia visando ao controle de praga de solo

Ricardo Antônio Polanczyk

Eng. Agrônomo, Prof. Dr. Laboratório de Entomologia, Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Espírito Santo
E-mail: ricardo@cca.ufes.br

Luiz Carlos de Almeida

Eng. Agrônomo, MSc. Coordenadorias de Recursos de Variedades. Centro de Tecnologia COPERSUCAR.
E-mail: almeida@copersucar.com.br

Luiz Padulla

Biólogo. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (ESALQ/USP)
E-mail: luizpadulla@bol.com.br

Sérgio Batista Alves

Eng. Agr. Prof. Dr. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (ESALQ/USP)
E-mail: sebalves@esalq.usp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

Este artigo aborda duas situações reais: controle de *Diatraea saccharalis* (broca-da-cana-de-açúcar) com o parasitóide *Cotesia flavipes*; monitoramento do besouro *Migdolus firyanus* com feromônio e um etapa a ser desenvolvida que visa ao controle de outro besouro (*Sphenophorus levis*); a geração de plantas expressando toxina(s) da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), visando minimizar ou substituir o uso de agrotóxicos. Este trabalho descreve a importância dessas pragas e de como as alternativas de controle não-convencionais podem contribuir no seu manejo, de forma mais eficiente e menos agressiva ao ambiente do que a utilização de inseticidas convencionais. Como etapa inicial de estudo, foi realizada a seleção de isolados de *Bt* para o *sphenophorus*, resultando no primeiro relato de suscetibilidade de *S. levis* para esse entomopatógeno.

Introdução

Diatraea saccharalis (broca-da-cana-de-açúcar)

É a principal praga da cana, sendo provavelmente originária da América Central e do Sul. O adulto é uma mariposa com as asas anteriores de coloração amarelo-palha, com alguns desenhos pardacentos e as asas posteriores esbranquiçadas e com 25 mm de envergadura. As lagartas após a eclosão alimentam-se do parênquima das folhas, depois se deslocam para a bainha e penetram pela parte mais mole do colmo abrindo galerias de baixo para cima. Os prejuízos são diretos pela abertura de galerias, que ocasionam perda de peso da cana e provocam a morte das gemas, causando falhas na germinação. Quando a broca faz galerias transversais, seccionando o colmo, elas provocam o tombamento da cana pelo vento. Nas canas novas, a broca produz o secamento dos ponteiros (coração morto). Os prejuízos indiretos são consideráveis, uma vez que através

dos orifícios e galerias penetram fungos que causam a podridão vermelha do colmo. Os fungos causadores são *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, que invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo e dando menos rendimento de açúcar e álcool. Trabalhos desenvolvidos pela ESALQ/USP, COPERSUCAR e UFSCar mostram que para cada 1% de intensidade de infestação da praga, ocorrem prejuízos de 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77% de peso (Gallo et al., 2002).

Juntamente com medidas de controle cultural, o controle biológico com o parasitóide *Cotesia flavipes* é uma alternativa não convencional de manejo dessa praga que contribuiu significativamente para a diminuição do impacto da broca sobre a cana. Este himenóptero foi introduzido no Brasil em 1974 e entre 1980 e 2002 a intensidade de infestação dessa praga diminuiu de 11% para 2,8%. Neste período foram liberados 14,8 bilhões de adultos em 2,44 milhões de hectares a um custo de R\$ 7,14 por hectare, implicando um custo de R\$ 16,7 milhões. Isto



Figura 1: Adulto de *Sphenophorus levis* (bicudo da cana-de-açúcar)



Figura 2: Larva de *S. levis*

significou uma economia de R\$ 88,4 milhões, pois não foram aplicados mais de 700.000 litros de inseticidas para o controle da *D. saccharalis*.

***Migdolus fryanus* (besouro migdolus)**

M. fryanus é um besouro da família Cerambycidae cuja fase larval causa danos ao sistema radicular da cana-de-açúcar, que passa a exibir sintomas de seca, iniciando com o secamento das folhas mais velhas. Com a evolução dos sintomas pode ocorrer o secamento de todas as folhas, morte da gema apical e até murcha dos colmos. Os danos podem se estender aos internódios basais dos colmos, prejudicando a brotação das soqueiras nos próximos cortes, o que contribui para o declínio acentuado na produtividade das áreas infestadas e obriga o produtor a renovar precocemente o seu canavial, existindo relatos de renovações de áreas que foram feitas logo após o segundo corte. Ocorre, em média, uma redução de 25 toneladas/ha/ano nas áreas infestadas, comparadas com parcelas tratadas com inseticidas de solo.

O conhecimento restrito sobre a biologia e ecologia da praga dificulta a adoção de métodos alternativos de controle. Sabe-se que apenas a larva causa danos e que a duração desta fase é de, no mínimo, dois anos, sendo encontrados indivíduos até a profundidade de cinco metros no solo. Todo o

ciclo biológico é subterrâneo, sendo possível coletar adultos na superfície do solo apenas por ocasião das “revoadas”, quando só os machos, que apresentam asas funcionais, voam nas áreas infestadas até localizarem as fêmeas que se encontram abrigadas no solo ou expostas na superfície e que não possuem asas funcionais. A atração ocorre em função de um potente feromônio sexual emitido pelas fêmeas, sendo que estas, logo após o acasalamento, penetram novamente no solo e realizam a deposição dos ovos isolados, em número médio de 25 ovos por fêmea, a profundidades que ultrapassam 1,5 metro.

No estado de São Paulo estima-se a existência de 50.000 ha de cana afetados por esta praga e sua presença foi constatada também nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais.

Existe no mercado um feromônio sexual para essa praga do grupo amida, que é comercializado em “pellets” de 3,5%, ou seja, 1 mg/”pellet”. Ele pode ser usado para monitoramento empregando-se uma armadilha por talhão de 10 a 20 ha, entre outubro e março, com substituição dos “pellets” a cada 3 a 4 semanas (Gallo et al., 2002). A descoberta, identificação, isolamento e síntese do feromônio contou com a participação de pesquisadores brasileiros. Da sua identificação até a síntese passaram-se pouco mais de três anos, sendo hoje utilizado na quase totalidade das usinas e destilarias da região Centro Sul do Brasil. Além do grande potencial de uso no monitoramento, este foi o primeiro caso no mundo de um feromônio sexual de ação a longa distância entre os cerambycídeos (Bento et al., 2001).

***Sphenophorus levis* (Coleoptera:Curculionidae)**

Conhecido como sphenophorus ou besouro-bicudo da cana-de-açúcar (Figura 1), causa danos aos perfilhos e na base dos colmos em desenvolvimento, reduzindo o número de plantas por área e a produ-

tividade das áreas infestadas. As fêmeas perfuram a base de colmos e de perfilhos e efetuam a deposição de ovos que darão origem às larvas (Figura 2) responsáveis pelos danos. Estas, ao se alimentarem, escavam galerias e danificam os tecidos no interior das bases, podendo provocar a morte das plantas, falhas nas brotações das soqueiras e redução na longevidade dos canaviais, que muitas vezes não passam do segundo corte. Ocorrem prejuízos de, em média, 20 a 23 toneladas/ha/ano nas áreas infestadas.

Atualmente a praga encontra-se disseminada em 30 municípios próximos à região de Piracicaba, além de cinco municípios mais distantes, existindo a perspectiva de aumento de sua dispersão de ano a ano. A disseminação da praga por meio do trânsito de mudas é a hipótese mais provável para explicar a rápida expansão da área infestada, visto que o inseto praticamente não voa e seu caminhar é lento, com uma reduzida taxa de dispersão.

O método mais recomendado para o controle da praga é o cultural, que consiste na destruição antecipada das soqueiras nas áreas infestadas, destinadas à reforma, preferencialmente no período de maio a setembro. A seguir a área deverá ser mantida livre de plantas hospedeiras da praga e o próximo plantio deverá ser realizado o mais tarde possível, em março-abril, em ciclo de cana de ano e meio, reduzindo, desta forma, a probabilidade de infestação a partir dos adultos que normalmente estão presentes em maiores quantidades no período de janeiro a março. As mudas a serem utilizadas no plantio deverão estar isentas da praga, sendo originárias de áreas não infestadas ou tendo sido colhidas em sistema de corte basal alto com até 20cm acima do nível do solo.

Os métodos de controle que incluem a aplicação de inseticidas ou a distribuição de iscas tóxicas apresentam as desvantagens de necessitarem o dispêndio elevado com mão-de-obra e a necessidade de reaplicações constantes.

Em relação às áreas destinadas ao plantio de viveiros, recomenda-se o preparo antecipado e a inspeção das mudas provenientes do viveiro anterior, que deverão estar totalmente isentas de qualquer forma biológica da praga, sendo

adotado o corte basal alto em situações de necessidade de uso de determinada muda com a presença da praga.

Biotechnologia X *Sphenophorus levis*

No Brasil, a área cultivada de cana-de-açúcar sofrerá nos próximos anos um incremento significativo devido, principalmente, ao interesse de alguns países, como Japão e China, em importar álcool para se adequarem ao Tratado de Kioto, que regula a emissão de gases poluentes na atmosfera. Certamente a importância dessa praga vai aumentar com o incremento da área plantada, sendo necessário a busca por novas táticas de controle menos agressivas ao meio ambiente.

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é empregada no controle de diversas pragas, existindo mais de 200 produtos disponíveis no mercado. Uma das descobertas que aumentou sua utilização ocorreu em 1983, quando foi isolado e caracterizado o *Bt tenebrionis*, eficaz contra coleópteros. Desde então muitos estudos foram desenvolvidos, e atualmente existem produtos eficazes para estes insetos. Entre os aspectos favoráveis destes produtos, destacase: seletividade, preservando o ambiente e os inimigos naturais das pragas (Glare & O'Callaghan, 2000).

As toxinas Cry responsáveis por grande parte da atividade inseticida desse patógeno localizam-se nos cristais protéicos. Geralmente cada toxina Cry é caracterizada por um gene *cry* específico, o que facilita a sua manipulação genética. Com os avanços na engenharia genética foi possível, em 1985, a obtenção da primeira planta geneticamente modificada resistente a insetos. Estas plantas têm apresentado algumas limitações quanto a sua eficácia, principalmente devido à rápida evolução da resistência (Glare & O'Callaghan, 2000) causada pela grande pressão de seleção que exercem sobre os insetos (Tappeser, 1997). Porém, se adequadamente manejadas e usadas racionalmente (Tappeser, 1997; Neppl, 2000), representam uma importante tática dentro do manejo integrado.

O impacto de produtos à base de *Bt* e plantas-*Bt* no ambiente é pouco estudado, embora muitas especulações sejam feitas. As principais preocupações são: expressão de características fenotípicas indesejáveis, fluxo gênico e permanência das toxinas no solo após a morte da planta (Glare & O'Callaghan, 2000). Porém, os relatos sobre esses impactos citados são raros, ao passo que os agrotóxicos têm efeitos negativos já comprovados tanto sobre o ambiente como para a saúde humana. Além disso, esse produtos podem afetar os inimigos naturais que atuam no controle biológico natural de outras pragas, como *D. saccharalis*.

Deve-se ressaltar que a utilização de plantas geneticamente modificadas evita o trânsito e utilização em demasia de máquinas e implementos, que pode compactar e comprometer a estrutura do solo. Tal premissa está de acordo com estudos realizados pela Universidade de São Paulo, que apontam a viabilidade do preparo reduzido do solo nesta cultura. Em 5 anos, os dados dos sistemas de preparo indicaram uma diminuição de custos da ordem de 28,9% entre os preparos convencional e reduzido, e de 46,9% na comparação entre convencional e direto (Luz et al., 2003).

É importante enfatizar que essa praga ocorre em reboleiras, e a utilização de plantas expressando toxinas Cry, somente nestes locais favorece o manejo da evolução resistência dos insetos a planta-*Bt*, pois diminui a pressão de seleção destas plantas sobre as populações das pragas, preservando indivíduos suscetíveis que ao cruzar com os resistentes retardam a evolução resistência (Neppl, 2000). Outro fato favorável é que a cana-de-açúcar é colhida antes do florescimento, evitando o risco de fluxo gênico entre as plantas de espécies diferentes.

De um modo geral, as autoridades responsáveis pela liberação do cultivo de plantas geneticamente modificadas estão sofrendo pressões para reduzir ou proibir o seu plantio em muitos países devido, principalmente, à falta de trabalhos independentes sobre o impacto do seu uso no agroecossistema. Glare & O'Callaghan (2000) enfatizam a necessidade de realização destes estudos para verifi-

car a viabilidade desta tática de controle dentro do contexto do manejo integrado de pragas.

No caso da cana-de-açúcar, a pesquisa deve iniciar pela seleção em laboratórios de isolados do patógeno eficientes contra as pragas (testes de patogenicidade, virulência) ou por material já caracterizado contendo toxinas Cry ativas para as espécies-alvo em questão (Cry1J, IH, 3 e 8). Após esta etapa, os genes *cry* selecionados serão clonados e sequenciados para posterior inserção na planta por técnicas de transgenia. Após a obtenção da planta geneticamente modificada, serão conduzidos testes em campo para avaliar a eficiência. Todas as partes da planta ou somente a sua parte inferior podem expressar a(s) toxina(s) escolhida(s) e quando o inseto se alimenta da planta, este ingere a toxina, cessa a sua alimentação em 5-10 min, e morre cerca de 3 dias após a ingestão.

Com a finalidade de selecionar isolados de *Bt* eficientes para o esse curculionídeo estão sendo realizados ensaios em laboratório para verificar a patogenicidade (se *Bt* causa morte do inseto ou não) e, posteriormente, virulência (agressividade do agentes patogênico), uma vez que nada existe na literatura sobre efeito desse entomopatógeno sobre o *sphenophorus*.

Bioensaio de patogenicidade

O isolamento do *Bt* a partir de amostras de solos e o bioensaio foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) em Piracicaba-SP.

Neste bioensaio foram utilizados isolados de *Bt* obtidos a partir de amostras de solos, conforme método adaptado da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1985), onde cada amostra de 1 g do substrato foi homogeneizada em 10 mL de solução salina (0,006 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 mM $\text{CaCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,07 mM $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,006 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0) e submetida à agitação durante 24 h. Uma alíquota de 1 ml foi transferida

Isolado	Mortalidade (%)*
ESALQ <i>Bt</i> 95	26,66 a
TESTEMUNHA	8,88 b
ESALQ <i>Bt</i> 245	8,88 b
ESALQ <i>Bt</i> 20	6,66 b
ESALQ <i>Bt</i> 246	6,66 b
ESALQ <i>Bt</i> 5	6,66 b
ESALQ <i>Bt</i> 277	4,44 b
ESALQ <i>Bt</i> 244	2,22 b
ESALQ <i>Bt</i> 279	0 b

Tabela 1: Atividade de isolados de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Sphenophorus levis*.

para tubo de microcentrífuga tipo “ependorf” e, após choque térmico (80 °C por 12 min) para eliminar as células vegetativas, foi diluída 10 e 100 vezes em solução salina. Uma alíquota de 100 ml da última diluição foi distribuída em placa de Petri contendo ágar nutritivo (0,05% extrato de levedura; 0,01% de tripton; 0,17 M NaCl e 0,023% de ágar bacteriológico). O material foi então mantido em estufa, 30 °C durante 48 h.

As colônias obtidas foram avaliadas quanto à morfologia (forma, bordo, elevação, estrutura, tamanho e coloração), selecionadas para as características correspondentes a bacilos e transferidas para meio contendo penicilina G a 100 mg/L, seletivo para *B. thuringiensis* e *B. cereus* (Jung et al., 1998). Os isolados inoculados neste meio foram mantidos 24 h a 30 °C e 180 rpm no agitador. Após este período cada amostra foi individualmente analisada quanto ao crescimento do microrganismo. Em seguida foram preparadas lâminas e observadas em microscopia de contraste de fase para a verificação da presença de corpos de inclusões parasporais (cristais) que permitem a diferenciação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*.

Após, os isolados foram cultivados por 48 h em ágar nutritivo. Após esse período foram feitas diluições sucessivas (10 e 10 x) para a determinação do número de esporos/mL para se obter uma suspensão com 3×10^8

esporos/mL, conforme Alves & Moraes (1998). Em seguida, 100mL dessa suspensão foi aplicada na superfície de um placa (3 x 1,5 cm) contendo dieta artificial apropriada para o desenvolvimento do inseto, sobre a qual foi colocada uma larva (0,03g de peso médio), após a evaporação do excesso de água. Os insetos utilizados são provenientes de uma criação laboratorial pertencente ao Núcleo de Pesquisa da

COPERSUÇAR em Piracicaba-SP. Para cada isolado, denominados como ESALQ *Bt* – 5, 20, 95, 244, 245, 246, 277 e 279, foram testados 45 insetos distribuídos em 3 repetições. O material foi acondicionado em B.O.D. a $70 \pm 10\%$ RU e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e a avaliação da mortalidade foi feita 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Os dados foram submetidos a Tukey 5% para verificar a diferença entre os tratamentos (SAS Institute, 1982).

Apesar da maior mortalidade observada ter sido baixa (26,66%), o resultado obtido com o isolado ESALQ *Bt* 95 mostra que a bactéria *Bacillus thuringiensis* é patogênica (tem atividade tóxica) para *S. levis*, mostrando potencial para ser utilizada no controle de praga. Este é o primeiro relato de atividade desse entomopatógeno para o *sphenophorus*. A seleção dos isolados continuará a fim de encontrar um isolado altamente virulento que possa ser utilizado em transgenia visando ao controle dessa praga.

Conclusão

Este trabalho mostrou que a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* é promissora para o controle de *S. levis*.

Literatura citada

Alves, S.B.; Moraes, S.B. Quantificação de inóculo de patógenos de inse-

tos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 23, p.765-778.

Bento, J.M.S.; Vilela, E.F.; Lucia, T.M.C.D. Considerações sobre a história do estudo e emprego de feromônios no Brasil. In: VILELA, E.F.; LUCIA, T.M.C.D. (Eds.). **Feromônios de insetos**. 2. ed. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001. cap 18, p.147-160.

Glare, T. R.; O’Callaghan, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350 p.

Jung, Y.C.; Kim, S.U.; Côte, J.C. et al. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. *Higo* strain isolated from rice bran in Korea. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, n.1, p.95-96, 1998.

Luz, P.H.C.; Montezuma, M.; Scaléa, M. Plantio direto e preparo reduzido ganham terreno. **JornalCana**, n.111, p.34-36, 2003.

Neppl, C. C. **Managing resistance to Bacillus thuringiensis toxins**. B.A. Tese. Universidade de Chicago, 2000. 35 p.

SAS Institute. User’s Guide: Statistics. SAS Institute. Cary, NC, 18, 1982. 520p.

Teppeser, B. The differences between conventional *Bacillus thuringiensis* strains and transgenic insect resistance plants. Possible reasons for rapid resistance development and susceptibility of non-target organisms. **Open-Ending Group on Safety**, 6 p. 1997.

World Health Organization. **Informal consultation on the development of Bacillus sphaericus as a microbial larvicide**. Geneva/UNDP: World Bank/WHO. 24 p. Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).