

EFEITO DO FEROMÔNIO DE ALARME DO PERCEVEJO
VERDE, *Nezara viridula* (L.) (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE), SOBRE O FUNGO
ENTOMOPATOGENICO *Metarhizium anisopliae*
(METSCH.) SOROK.

Miguel Borges¹, Soraya C.M. Leal¹, Myrian S. Tigano-Milani¹ e Maria
C.C. Valadares¹

ABSTRACT

Effect of the Alarm Pheromone of the Southern Green Stink Bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) on the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

The effect of the alarm pheromone extract of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.), and some of the synthetic pheromone fractions, were evaluated against the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. It was observed an irreversible inhibition on the germination of *M. anisopliae* spores, owing to the compounds trans-2-decenal and trans-2-hexenal. These compounds are reported as fungal inhibitors or fungicides.

KEY WORDS: Insecta, trans-2-decenal, trans-2-hexenal, inhibitors, fungicides.

RESUMO

O efeito da mistura feromonal de alarme do percevejo verde *Nezara viridula* (L.), e de suas frações sintéticas, sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., em laboratório, foi avaliado. Por inibirem irreversivelmente a germinação dos esporos de *M. anisopliae*, os compostos trans-2-decenal e trans-2-hexenal são apresentados como substâncias antifúngicas.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, trans-2-decenal, trans-2-hexenal, inibidores, fungicida.

Recebido em 26/07/92.

¹CENARGEN/EMBRAPA, Caixa postal 02372.000, Brasília, DF.

INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos apresentam algumas vantagens sobre os demais patógenos, por atuarem no hospedeiro tópicamente, enquanto os vírus e as bactérias necessitam ser ingeridos para causarem sintomas patológicos. Assim a capacidade infectiva não fica limitada a insetos mastigadores, podendo afetar, ainda, Homoptera, Hemiptera e outros artrópodos dotados de aparelho bucal do tipo sugador (McCoy & Tigano-Milani 1990). Dentre os gêneros mais importantes de fungos entomopatogênicos encontram-se *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora*; no Brasil *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. vem sendo produzido e utilizado com relativo sucesso para o controle de cercopídeos que atacam as pastagens e a cana-de-açúcar (Alves 1986). Trabalhos visando detectar a ocorrência e a patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., sobre populações naturais de Pentatomidae (Hemiptera), demonstraram uma baixa mortalidade tanto natural como em testes em laboratório (Moscardi et al. 1987, Faria et al. 1991). Estudos sobre a integração entre fungos entomopatogênicos e feromônios para controle destes pentatomídeos indicaram que substâncias voláteis produzidas pelo inseto poderiam estar inibindo a germinação do fungo (Borges, dados não publicados). Secreções voláteis de Cydnidae (Hemiptera) possuem ação fungicida ou fungistática, além de serem repelentes às formigas e nematóides de solo (Timonin 1958, 1961a,b, Roth 1961, citados por Becker 1967). Remold (1963), descreveu as secreções voláteis de pentatomídeos como um veneno de contato, causando paralisia em formigas e outros insetos. Kuwahara et al. (1989) relataram atividade antifúngica do feromônio sexual de *Caloglyphus poluphyllae* e de secreções de ácaros.

Esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da mistura feromonal de alarme do percevejo verde, *Nezara viridula* (L.) e suas frações sintéticas sobre o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.

MATERIAL E MÉTODOS

O percevejo verde, *N. viridula*, foi criado em laboratório a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% U.R. e 14 horas de fotofase. O método de criação descrito por Harris & Todd (1980) foi seguido utilizando-se uma dieta a base de feijão de vagem, semente de amendoim e soja. Usou-se a linhagem de *M. anisopliae*, CG 34, isolada de *Conotrachelus* sp. Esta linhagem foi escolhida por ter-se mostrado a mais eficaz contra *N. viridula* (Faria et al. 1991). Como a composição do feromônio de alarme varia de acordo com a idade, instar, sexo e estado fisiológico (Blum 1981), as ninfas utilizadas para extração de feromônio foram todas de 5º instar. Vinte ninfas foram introduzidas em uma pequena câmara da aeração (30 ml) e pertubadas até libertarem o feromônio, que foi capturado por um sistema de vácuo em carvão ativado. Após vinte minutos o sistema foi desconectado e o feromônio total extraído com diclorometano. Para uma avaliação mais refinada do efeito inibitório do feromônio sobre o fungo, foram também testados os seis compostos que estão presentes em maior quantidade na mistura feromonal (Lockwood & Story 1987): n-tridecano* (NT), dodecano** (Dod), trans-2-hexenal* (TH), trans-2-decenil

acetato* (TDA), trans-2-decenal* (TD) e trans-2-hexenil acetato** (THA), (* = Alfa, Morton Thiokol, ** = Aldrich). Foram utilizados compostos sintéticos na concentração de 5µg/µl. Os esporos foram semeados em placa de Petri contendo meio completo (MC) sólido. Embebeu-se um disco de papel filtro estéril de 5mm de diâmetro com 5µl da solução-teste e aplicou-se, após a evaporação do solvente, no centro da placa. As placas foram mantidas a 28°C e avaliadas após 21 horas, calculando-se a porcentagem de germinação dos esporos em 5mm do disco. Foram feitas seis repetições e contados 100 esporos por repetição. Após 72 horas, foi medido o diâmetro do halo de inibição (região na qual os esporos não germinam). Foram medidos três halos em cada uma das seis repetições. Os controles foram feitos com o solvente cloreto de metileno.

Após a avaliação do poder inibitório das frações do feromônio de alarme, averiguamos uma possível integração entre TD e TH no período de 72 horas. Os mesmos foram misturados em proporções iguais (1:1, v/v) e ensaiados juntos e separadamente sobre *M. anisopliae*. A viabilidade dos esporos em contato com as frações sintéticas de feromônio foi determinada após a avaliação do efeito sinérgico entre TD e TH, que durou 27 h. Foram retirados os discos das placas, que levavam esporos aderidos, e foram reinoculados em MC. A avaliação foi feita após 48 horas. Sendo os compostos trans-2-decenal e o trans-2-hexenal considerados voláteis, a persistência da inibição dos fungos após 72 horas da incubação passou a ser também objetivo de estudo nesta fase do trabalho. Uma hipótese provável foi a da polimerização destes compostos e outra, a da degradação dos mesmos, dando origem a álcoois ou peróxidos.

Os compostos TD e TH novos (soluções recém preparadas) e antigos (soluções com mais de três meses de armazenamento) foram levados à cromatografia para se averiguar a presença de produtos de transformação dos compostos originais (Fig. 1).

Foram averiguadas possíveis diferenças existentes no efeito dos compostos antigos e novos. Os esporos foram semeados em MC sólido. No centro da placa aplicou-se 0,5µl do composto a ser testado e cobriu-se com uma lamínula de 4 cm², de maneira que o composto ficasse mais tempo em contato com os esporos. Após 24h foi contada a germinação dos esporos abaixo da lamínula e a 2 cm da mesma.

Para a determinação da presença de peróxidos nas frações de feromônio foram embebidos 50 discos de papel com TD e TH recém preparados e deixados à temperatura ambiente (22°C) durante a noite. Após aproximadamente 30h foram resuspensos em diclorometano, à mesma concentração final. As soluções TD e TH resuspensas, as novas e as antigas foram testadas quanto à presença de peróxidos. Papéis filtro impregnados com iodeto de potássio (KI) foram embebidos como o composto a ser testado; na presença de peróxidos papel, que é branco, torna-se pardo.

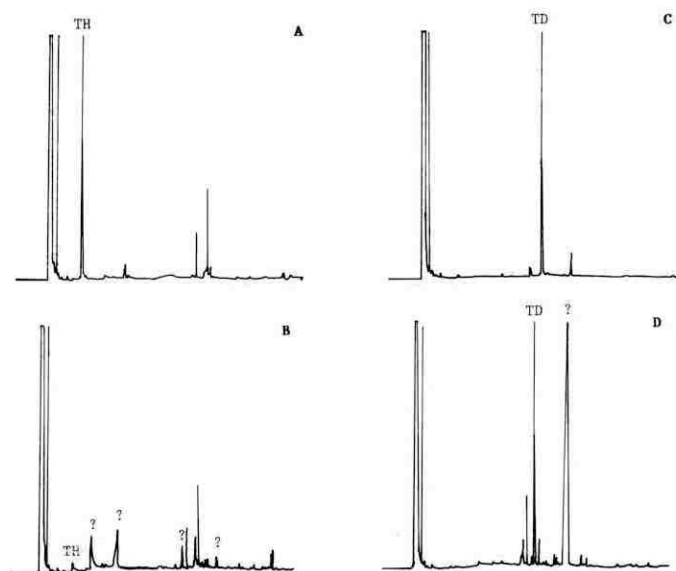


Figura 1. Cromatograma dos compostos *trans*-2-hexenal (TH) e *trans*-2-decenal (TD) (5µg/µl). (A) solução de TH recém preparada; (B) vários produtos (?) da transformação de TH; (C) solução de TD recém preparada; (D) um composto predominante (?) da transformação de TD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato do feromônio de alarme total, obtido por aeração, causou inibição dos esporos de *M. anisopliae*, bem como as seis frações sintéticas testadas sobre os esporos do fungo (Tabela 1, 21 horas e Tabela 2, 72 horas de incubação), destacando-se o *trans*-2-decenal (TD) e o *trans*-2-hexenal (TH). No ensaio feito para averiguar se havia sinergismo do efeito de *trans*-2-decenal e *trans*-2-hexenal, não foi encontrada diferença na inibição da germinação de esporos pelos compostos isolados e pela mistura deles (Fig. 2).

Tabela 1. Percentagem da germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* expostos a frações sintéticas de feromônio de alarme de *Nezara viridula* após 21h de incubação a 0,5 cm do disco (média de 6 repetições).

Compostos	Fração	
	2µg/µl	5µg/µl
Dod (dodecano)	61,0	61,3
TH (<i>trans</i> -2-hexenal*)	62,0	15,8
TD (<i>trans</i> -2-decenal*)	50,6	0,0
NT (n-tridecano*)	61,7	73,3
THA (<i>trans</i> -2-hexenil acetato**)	57,5	63,6
TDA (<i>trans</i> -2-decenil acetato**)	63,3	59,0
Controle	76,0	76,0

Os esporos de *M. anisopliae* aderidos ao disco de papel-filtro, ou seja, os que tiveram contato direto com TD ou TH não germinaram mesmo após transferidos para outra placa (72 horas), indicando uma inativação dos esporos (Fig. 3).

Tabela 2. Diâmetro do halo de inibição dos compostos sintéticos do feromônio de alarme de *Nezara viridula* ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) após 72h de incubação (média de 6 repetições).

Compostos	Diâmetro do halo (mm)
Dod (dodecano)	0,0
TH (<u>trans</u> -2-hexenal*)	1,16
TD (<u>trans</u> -2-decenal*)	1,66
NT (n-tridecano*)	0,00
THA (<u>trans</u> -2-hexenil acetato**)	0,00
TDA (<u>trans</u> -2-decenil acetato*)	0,00
Controle	0,00

O fato de os esporos aderidos ao disco de papel (os que entraram em contato com os compostos TD e TH) não germinarem, sugere uma possível polimerização dos compostos, formando produtos menos voláteis ou ainda produtos da degradação destes últimos. Além disso, os compostos podem causar inativação nos esporos, sendo, possivelmente, fungistáticos ou fungicidas.

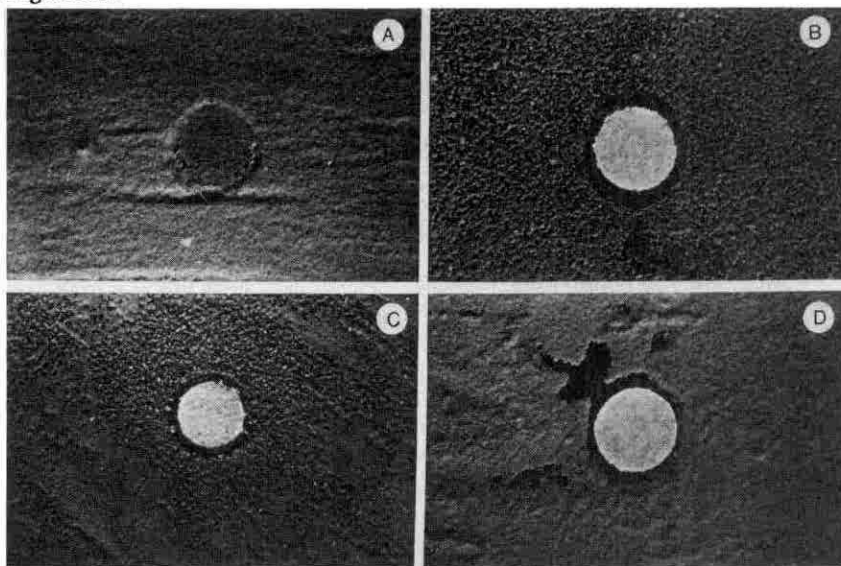


Figura 2. Halo de inibição ($\approx 0,5\text{mm}$) de *M. anisopliae* (CG 34) provocado por compostos sintéticos de feromônio ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$). (A)=Controle (CH_2Cl_2), (B)=trans-2-decenal, (C)=trans-2-hexenal e (D)=trans-2-decenal + trans-2-hexenal (1:1, v/v).

O cromatograma dos compostos novos e antigos TD e TH (Fig. 1) indica a transformação parcial dos mesmos em substâncias com maior tempo de retenção, provavelmente moléculas maiores. Isto sugere que se formam, a partir das moléculas originais, polímeros ou peróxidos (J. Aldrich, USDA-ARS e H. Monteiro, Departamento de Química, Universidade de Brasília, comunicação pessoal).

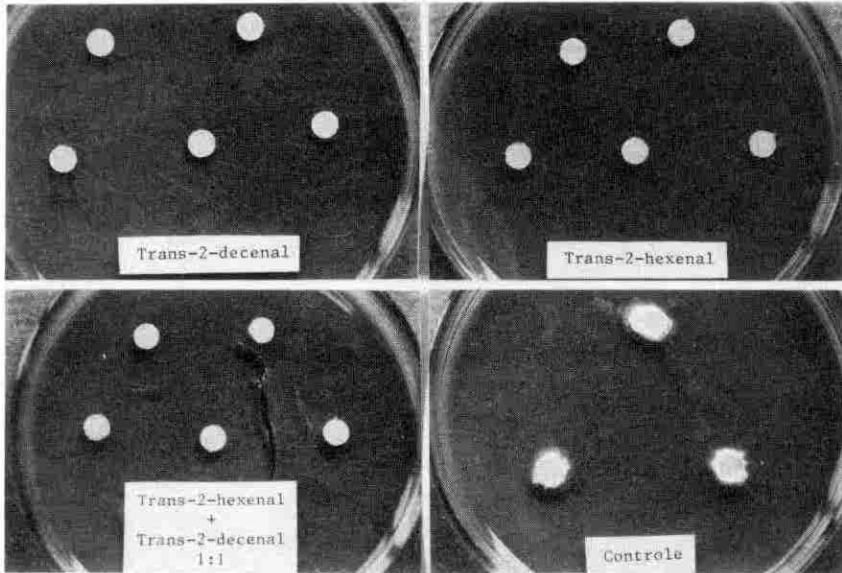


Figura 3. Discos de papel-filtro contendo esporos de *M. anisopliae* em contato com *trans*-2-decenal e *trans*-2-hexenal ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e sua mistura, indicando a germinação no controle e a inativação dos esporos pelos compostos ($- = 0,5\text{mm}$).

Não houve diferença da inibição causada pelos compostos novos e antigos, sendo a mesma quase total. Os papéis filtro embebidos nos compostos TD e TH novos permaneceram brancos. No entanto, os que foram embebidos nos compostos antigos, ou resuspendidos tornaram-se pardos. Isto indica a presença de peróxidos nos produtos de transformação dos compostos TD e TH (Perrin *et al.* 1966). Pelas análises cromatográficas, eles são menos voláteis que os compostos originais tendo, portanto, maior probabilidade de entrar em contato com os esporos. Sabe-se que os peróxidos são extremamente tóxicos às células, pois atacam os ácidos graxos insaturados da membrana celular, provocando lesão (Lehninger 1986). Portanto, pode-se inferir aos mesmos a inibição dos esporos ou, pelo menos, parte dela. De acordo com as análises cromatográficas, os produtos da transformação dos compostos TD e TH, possivelmente peróxidos, podem também inibir a germinação de esporos de *M. anisopliae*. Por inibirem irreversivelmente a germinação de esporos de *M. anisopliae*, *trans*-2-decenal e *trans*-2-hexenal (ou produtos de sua transformação) têm o potencial de serem utilizados como substâncias antifúngicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a cooperação dos Drs. Dueben & Heath, USDA/ARS/Insect Chemistry, Gainesville, FL. por gentilmente nos fornecer as frações sintéticas do alarme de *Nezara viridula*. Aos Drs. Jeffrey R. Aldrich, USDA/ARS/Insect Chemical Ecology Laboratory, Beltsville, MD. e Hugo Monteiro, UnB/Departamento de Química, Brasília, DF., pelas valiosas discussões da parte química deste trabalho. Ao Dr. Bonifácio P. Magalhães, CENARGEN/Área de controle Biológico, Brasília, DF. pelas valiosas sugestões nos bioensaios com o fungo entomopatogênico. Ao CNPq e FINEP, pelas bolsas e pelo auxílio cedido.

LITERATURA CITADA

- Alves, S.B. 1986. Fungos entomopatogênicos, p.73-126. In: S.B. Alves (ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole. 407p.
- Becker, M. 1967. Estudos sobre a subfamília Scaptocorinae na região neotropical (Hemiptera: Cydnidae). Arq. Zool. S.Paulo 15: 291-325.
- Blum, M.S. 1981. Chemical defenses of arthropods. New York, Academic Press, 562pp.
- Faria, M.R. de, M.S. Tigano, M. Borges, & R.S. Carvalho. 1991. Avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos ao percevejo da soja *Nezara viridula* (L. 1758) (Hemiptera: Pentatomidae), p. 246. In Resumos Congresso Brasileiro de Entomologia, 13, Recife, 366p.
- Harris, V.E. & J.W. Todd. 1980. Rearing the southern green stink bug, *Nezara viridula*, with relevant aspects of its biology. J. Georgia Entomol. Soc. 16: 203-211.
- Kuwahara, Y., W.S. Leal, T. Suzuki, M. Maeda & T. Masutani. 1989. Antifungal activity of *Caloglyphus poliphilae* sex pheromone and other mite exudates. Naturwissenschaften 76: 578-579.
- Lehninger, A.L. 1986. Princípios de bioquímica. São Paulo, Sarvier, 887p.
- Lockwood, J.A. & R.N. Story. 1987. Defensive secretion of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) as an alarm pheromone. Ann. Entomol. Soc. Am. 80: 686-691.
- McCoy, C.W. & M.S. Tigano-Milani. 1990. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. Proc. 2nd Symposium on Biological Control. Brasília, DF., Brazil.

- Moscardi, F., B.S. Corrêa Ferreira, E.D. Quintela & L.C. Leite. 1987.** Ocorrência e patogenicidade de fungos entomógenos sobre percevejos-pragas da soja, p. 189. In Resumos Congresso Brasileiro de Entomologia, 11, Campinas, 297p.
- Perrin, D.D., W.L.F. Armarego & D.R. Perrin. 1966.** Purification of laboratory chemicals. Oxford, Pergamon Press, 358p.
- Remold, H. 1963.** Scent-glands of land-bugs, their physiology and biological function. *Nature* 198: 764-768.