

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD)
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

ALESSANDRA FEQUETIA FREITAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SELEÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.
(DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) PARA O CONTROLE DE
Mahanarva fimbriolata (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) DA
REGIÃO DE MATO GROSSO DO SUL**

DOURADOS – MS
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD)
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

ALESSANDRA FEQUETIA FREITAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SELEÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.
(DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) PARA O CONTROLE DE
Mahanarva fimbriolata (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) DA
REGIÃO DE MATO GROSSO DO SUL**

Orientador(a): Elisângela de Souza Loureiro

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

DOURADOS – MS
2010

RESUMO GERAL

O objetivo desta pesquisa foi selecionar isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Deuteromycotina: Hyphomycetes) e determinar sua produção e a viabilidade visando o controle de cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). A seleção foi feita em condições de laboratório, utilizando-se ninfas coletadas a campo que foram pulverizadas com o fungo e mantidas em câmara climatizada a 25 ± 1 °C, 70 ± 10 UR e 12 fotofase. Exemplares de ninfas de cigarrinha da raiz foram separadas em grupos de 10 indivíduos e a seguir inoculadas em suspensões de esporos da ordem de $1,0 \times 10^9$; $0,5 \times 10^9$; $1,0 \times 10^8$; $5,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^7$ conídios/mL. Na etapa de produção foram colocados em sacos de polipropileno medindo 35 cm de comprimento e 22 cm de largura 100 g de arroz pré-cozido e imediatamente autoclavado a 120 °C por 25 min. Após o resfriamento do arroz, inoculou-se 1 mL de uma suspensão contendo $1,0 \times 10^9$ conídios/mL, sendo acondicionados em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, $70\pm 10\%$ de UR e fotofase de 12h, os quais foram incubados por 10 dias. Decorrido esse período, o arroz+fungo foi acondicionado em bandejas plásticas para promover a conidiogênese do fungo, dentro da câmara climática a 25 ± 1 °C, $70\pm 10\%$ de UR e fotofase de 12h. As bandejas ficaram empilhadas por 4 dias, cruzando-as por mais 4 dias. Foi observada a mortalidade total, a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott e a mortalidade confirmada. No geral, observou-se que a concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL foi a que apresentou maior efeito sobre *M. fimbriolata* dentre as demais concentrações testadas. O valor de TL_{50} (2,75 dias) proporcionado pela concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL é menor dentre os demais TL_{50} analisados. Na fase de seleção, entre os 24 isolados de *M. anisopliae* avaliados, sete isolados (UFGD 425, UFGD 22, PL 43, IBCB

348, UFGD 28, UFGD 05 e UFGD 03) causaram maior porcentagem de mortalidade confirmada das ninfas após o sétimo dia da inoculação, mostrando potencialidade como agentes de controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, matando pelo menos 70,0% da população. Na etapa de produção o isolado IBCB 425 foi o que produziu mais conídios em arroz com $1,82 \times 10^9$ conídios/g de arroz pré-cozido pelo método de bandeja. Com relação à viabilidade dos isolados, o IBCB 425 também apresentou maior capacidade de germinação dos conídios, com 94,84%.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, Controle biológico, Controle microbiano, Fungos entomopatogênicos.

ABSTRACT

The objective of this research was to select isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Deuteromycotina: Hyphomycetes) and determine their production and viability for the control of spittlebugs *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). The selection was carried out in laboratory conditions, using nymphs collected in the field were sprayed with the fungus and kept in an incubator at 25 ± 1 °C, RH 70 ± 10 and 12 h photophase. Samples of nymphs of spittlebugs were separated in groups of ten insects and inoculated in suspension of spores containing 1.0×10^9 ; 0.5×10^9 ; 1.0×10^8 ; 5.0×10^8 e 1.0×10^7 conidia/mL. In the stage of production the selected isolates of *Metarhizium anisopliae* were placed in polypropylene bags measuring 35 cm long and 22 cm wide 100 g of rice pre-cooked and immediately autoclaved at 120 °C for 25 min. After cooling, the rice was inoculated with 1 mL of a suspension containing $1,0 \times 10^9$ conidia/mL, packed an incubator at 25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ RH and 12h photophase. Plastic bags containing rice+fungus were incubated for 10 days. After this

period, rice+fungus was packed in plastic trays to promote conidia of the fungus, within the climatic chamber at 25 ± 1 °C, $70\pm 10\%$ RH and 12h photophase. The trays were stacked in 4 days, crossing them for another 4 days. Was observed the total mortality, mortality corrected by Abbott's formula and confirmed mortality. Overall, it was observed that the concentration of 1.0×10^9 conidia/mL showed the greatest effect on *M. fimbriolata* among the other concentrations. The value of TL_{50} (2.75 days) provided by the concentration of 1.0×10^9 conidia/ml is lower among the other TL_{50} analyzed. Among the 24 isolates of *M. anisopliae* evaluated, seven isolates (UFGD 425, UFGD 22, PL 43, IBCB 348, UFGD 28, UFGD 05 e UFGD 03) caused the highest percentage of confirmed mortality of nymphs after the seventh day after inoculation, showing potential as control agents of spittlebugs sugarcane, killing at least 70.0% of the population. IBCB 425 isolate was the most produced conidia on rice with 1.82×10^9 conidia/g rice pre-cooked by the tray method. Regarding the viability of the isolates, the IBCB 425 also showed a higher germination of conidia, with 94.84%.

KEY-WORDS: Insecta, Biological control, Microbial control, Entomopathogenic fungi.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
Artigo 1: Seleção de <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) para o controle de <i>Mahanarva fimbriolata</i> (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) em laboratório	7
Abstract.....	7
Resumo	8
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	11
Estabelecimento da concentração dos fungos entomopatogênicos	11
Seleção dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
Resultado e Discussão	14
Estabelecimento da concentração	14
Bioensaios de seleção de isolados	16
Agradecimentos.....	20
Referências Bibliográficas.....	20
Tabela I:.....	24
Figura I	24

Tabela II.....	25
Tabela III.	26
Figura II.	27
Artigo 2: Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) cultivados em arroz .	28
Abstract.....	28
Resumo	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	32
Produção de isolados em arroz	32
Resultados e Discussão.....	34
Produção em meio de arroz pré-cozido	34
Agradecimentos	37
Referências Bibliográficas.....	37
Tabela I.....	40
Conclusões.....	41

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) se encontra em um momento de grande expansão devido à boa rentabilidade que o comércio do açúcar e álcool combustível tem proporcionado ao setor. O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cana de açúcar e exportador de açúcar e álcool tendo uma área cultivada em torno de 8,9 milhões de hectares (Conab 2008).

Na colheita da cana-de-açúcar sem queima prévia, a palha e o palhiço são deixados no campo após o corte, proporcionando modificações edáficas e alterações no microclima da superfície do solo, como uma melhor manutenção da umidade, menor temperatura e aumento da matéria orgânica no solo, quando comparadas com o sistema de queima (Furlani Neto 1995; Barbosa 1998). Estas modificações têm favorecido o aumento da incidência e severidade dos danos causados pela cigarrinha da raiz, *Mahanarva fimbriolata* Stal (1854) (Hemiptera: Cercopidae) na cultura da cana-de-açúcar (Dinardo-Miranda *et al.* 1999; Mendonça 2005).

Com isso a cigarrinha da raiz se tornou uma das pragas de maior importância econômica para a cana de açúcar, sendo encontrada em altas populações em praticamente todas as regiões de São Paulo especialmente nas regiões mais quentes e úmidas causando danos significativos à cultura, por reduzir a produtividade agrícola e a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar, utilizada como matéria prima na indústria (Dinardo-Miranda *et al.* 1999, 2000, 2002). Situação semelhante encontra-se nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, onde é comum a ocorrência de altas infestações da cigarrinha da raiz em cana planta e soqueiras de cana queimada, devido à vizinhança da cultura com vastas áreas de pastagens, cujos capins também são hospedeiros de *M. fimbriolata* (Dinardo-Miranda 2003).

As fêmeas da cigarrinha da raiz *M. fimbriolata* fazem a postura dos ovos nos solos, próximos aos colmos. Suas ninfas vivem nas raízes, onde se fixam e sugam a seiva, produzindo uma espuma branca típica por meio da secreção das glândulas de Bateli e com o movimento de sua codícula, injetam bolhas de ar nesse fluido, dando formação a espuma que protege e recobre todo o seu corpo contra dessecação e vários inimigos naturais. Na seca, as ninfas deixam de produzir a espuma e morrem.

As ninfas ao se alimentarem das raízes provocam lesões no sistema vascular, comprometendo o transporte de água e nutrientes para os pontos de crescimento aéreo da planta. Os adultos sugam a seiva das folhas, injetando toxinas e causando clorose, necrose e posterior secagem das folhas, reduzindo o processo fotossintético, prejudicando a circulação da seiva do limbo foliar, ocasionando diminuição no conteúdo de sacarose no colmo e retardando a maturação (El-Kadi 1977; Dinardo-Miranda *et al.* 2002).

O controle microbiano com fungos entomopatogênicos especialmente *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Deuteromycotina: Hyphomycetes), tem tido sucesso com as cigarrinhas das raízes, uma vez que a espuma produzida pelas ninfas proporciona uma condição favorável ao crescimento do fungo. Além de outros fatores como sua facilidade de produção em laboratório, e por apresentar uma vantagem em relação aos outros entomopatógenos, podendo infectar tanto via oral, através dos espiráculos e pela superfície do tegumento (Alves 1998).

Outro fator para se utilizar o controle microbiano é a questão do custo, pois o valor médio por ha do controle microbiano custa em torno de R\$ 40,00, enquanto que o valor do controle químico custa R\$ 160,00/ha, ou seja, uma economia de R\$ 120,00 (Almeida *et al.* 2008). Ressalvando que o controle com inseticidas é pouco eficiente para as ninfas de cigarrinhas, pois estas se localizam nas touceiras e são protegidas por uma

espuma branca. A baixa eficiência dos produtos fitossanitários sintéticos gera a necessidade de várias aplicações, o que inviabiliza o controle (Almeida *et al.* 2008).

No Nordeste, desde a década de 70, *M. anisopliae* vem sendo produzido e comercializado com grande sucesso no controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* Stal (1855) (Hemiptera: Cercopidae) na cultura da cana-de-açúcar correspondendo a um dos mais bem sucedidos programas de controle biológico na América Latina (Alves *et al.* 1998; Alves *et al.* 2008). No entanto, existem limitações para a utilização de fungos; uma das mais importantes é a forma de conservação desses microrganismos, que mantenha a sua patogenicidade e virulência por pelo menos dois anos, em condições de fácil armazenamento e aplicação, fator que está intrinsecamente ligado às formulações (Loureiro *et al.* 2005). Outra grande limitação no desenvolvimento e comercialização de produtos microbianos é a correta caracterização e padronização da linhagem selecionada, visando a preservação da sua identidade durante o processo produtivo (Alves & Pereira 1998).

As técnicas de produção de fungos para controle de pragas devem ter baixo custo e permitir a obtenção de alta concentração de formas viáveis e virulentas do patógeno, que possam ser formuladas e utilizadas (Loureiro *et al.* 2005). A facilidade de produção em larga escala viabiliza a utilização destes agentes de maneira inundativa (Alves & Pereira 1998).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi selecionar isolados de *Metarhizium anisopliae* e avaliar sua produção e viabilidade para o controle de ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar no Estado de Mato Grosso do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, J. E. M.; A. Batista Filho; S. B. Alves; L. G. Leite; P. Neves. 2008. Formulação de entomopatógenos na América Latina, p. 257-278. In: S. B. Alves; R. B. Lopes. (Org.). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, viii+414p.

Alves, S. B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p.289-381. In: S. B. Alves (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, xi+1163 p.

Alves, S. B.; J. R. S. Lopes; L. F. A. Alves & A. Moino Júnior. 1998. Controle microbiano de artrópodos associados a doenças de plantas. In: I. S. Melo & J. L. Azevedo. **Controle biológico 1**: 143-170.

Alves, S. B.; J. R. S. Lopes; S. A. Vieira & M. A. Tamai. 2008. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina, p.71-103. In: S. B. Alves & R. B. Lopes (ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. FEALQ, Piracicaba, viii+414p.

Alves, S. B.; R. M. Pereira. 1998. Produção de fungos entomopatogênicos, p. 845-869. In: S. B. Alves (ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, xi+1163 p.

Barbosa, V. Cultivo de soqueira, adubação e reforma de canaviais sob sistema de cana crua, p.31-32. In: SEMANA DA CANA-DE-AÇÚCAR DE PIRACICABA, 4., 1998, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: 1998. p.31-32.

Conab, 2008 Disponível em <http://www.conab.gov.br/conabweb/>. **Acesso em: 30 jul. 2009.**

Dinardo-Miranda, L. L. 2003. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 72p.

Dinardo-Miranda, L. L., J. M. G. Ferreira, A. M. P. R. Durigan & V. Barbosa. 2000. Eficiência de inseticidas e medidas culturais no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos 18**: 34-36.

Dinardo-Miranda, L. L., P. Figueiredo, M. G. A. Landell, J. M. G. Ferreira & P. A. M. Carvalho. 1999. Danos causados pelas cigarrinhas das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos 17**: 48-52.

Dinardo-Miranda, L. L., V. Garcia & V. Parazzi. 2002. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos, na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology 31**: 609-614.

El-Kadi, M. K. Novas perspectivas no controle de cigarrinhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4., Goiânia, 1977. **Conferências, Palestras e Exposições**. Goiânia: SEB, 1977. p.58-67.

Furlani Neto, V. L. 1995. Colhedora de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) avaliação em canaviais com e sem queima prévia. 105f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Loureiro, E. S.; A. Batista Filho; J. E. M. Almeida; L. G. A. Pessoa. 2005. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854). **Arquivos do Instituto Biológico** 72: 469-472.

Mendonça, A. F. 2005. **Cigarrinhas da cana-de-açúcar: controle biológico**. Maceió: Insecta, 317 p.

**SELEÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.
(DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) PARA O CONTROLE DE
Mahanarva fimbriolata (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EM
LABORATÓRIO**

Alessandra Fequetia Freitas¹ & Elisângela de Souza Loureiro^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Dourados-MS. lezinhafreitas@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) Campus de Chapadão do Sul (CPCS), Antiga estrada da Fazenda Campo Bom, Caixa Posta 112, Chapadão do Sul-MS; lis_loureiro@yahoo.com.br; autor correspondente

**SELECTION OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.
(DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) FOR THE CONTROL OF
Mahanarva fimbriolata (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) IN
LABORATORY**

ABSTRACT

The objective of this research was to select isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) pathogenic to spittlebugs *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). The selection was carried out in laboratory conditions, using nymphs collected in the field were sprayed with the fungus

and kept in an incubator at 25 ± 1 °C, RH 70 ± 10 and 12 h photophase. Samples of nymphs of spittlebugs were separated cautiously in groups of ten insects and inoculated in suspension of spores containing 1.0×10^9 ; 0.5×10^9 ; 1.0×10^8 ; 5.0×10^8 e 1.0×10^7 conidia/mL. Was observed the total mortality, mortality corrected by Abbott's formula and confirmed mortality. Overall, it was observed that the concentration of 1.0×10^9 conidia/mL showed the greatest effect on *M. fimbriolata* among the other concentrations, observing the lesser value of TL_{50} (2.75 days). Among the 24 isolates of *M. anisopliae* evaluated, seven isolates (UFGD 425, UFGD 22, PL 43, IBCB 348, UFGD 28, UFGD 05 e UFGD 03) caused the highest percentage of confirmed mortality of nymphs after the seventh day after inoculation, showing potential as control agents of spittlebugs sugarcane, causing mortality confirmed of at least 70.0% of the population.

KEY-WORDS: Insecta, Biological control, Microbial control.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi selecionar isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Deuteromycotina: Hyphomycetes) patogênicos para cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata*. A seleção foi feita em condições de laboratório, utilizando-se ninfas coletadas a campo que foram pulverizadas com o fungo e mantidas em câmara climatizada a 25 ± 1 °C, 70 ± 10 UR e 12 fotofase. Exemplares de ninfas de cigarrinha da raiz foram cuidadosamente separadas em grupos de 10 indivíduos e a seguir inoculadas em suspensões de esporos da ordem de $1,0 \times 10^9$; $0,5 \times 10^9$; $1,0 \times 10^8$; $5,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^7$ conídios/mL. Foi observada a mortalidade total, a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott e a mortalidade confirmada. No geral, observou-se que a concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL foi a que apresentou maior efeito sobre *M.*

fimbriolata dentre as demais concentrações testadas, observando-se o menor valor de TL₅₀ (2,75 dias). Dentre os 24 isolados de *M. anisopliae* avaliados, sete isolados (UFGD 425, UFGD 22, PL 43, IBCB 348, UFGD 28, UFGD 05 e UFGD 03) causaram maior porcentagem de mortalidade confirmada das ninfas após o sétimo dia da inoculação, mostrando potencialidade como agentes de controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, causando mortalidade confirmada de pelo menos 70,0% da população.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, Controle biológico, Controle microbiano.

INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) encontra-se em um momento de grande expansão da área cultivada nas principais regiões produtoras do Brasil. Com a proibição da queima como etapa da operação de colheita, amparada em leis federal e estadual que estabeleceram um período de quatro anos para o fim desta prática agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul (Embrapa 2008). O incremento das áreas de colheita de cana sem queima prévia (cana crua) têm favorecido o aumento da incidência e severidade dos danos causados pela cigarrinha da raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) na cultura da cana-de-açúcar nos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Dinardo-Miranda *et al.* 1999; Mendonça 2005), beneficiadas pelo aumento de umidade no solo, em função do depósito de palha sobre ele, e pela não destruição dos ovos diapáusicos, proporcionando modificações edáficas e alterações no microclima da superfície do solo (Furlani Neto 1995).

Atualmente a cigarrinha é encontrada em altas populações em praticamente todas as regiões de São Paulo especialmente nas regiões mais quentes e úmidas

causando danos significativos à cultura, por reduzir a produtividade agrícola e a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar, utilizada como matéria prima na indústria (Dinardo-Miranda *et al.* 1999, 2000, 2002), sendo considerada atualmente uma das pragas de maior importância econômica para a cana-de-açúcar. Situação semelhante encontra-se em Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, onde é comum a ocorrência de altas infestações de cigarrinha em cana planta e soqueiras de cana queimada, devido à vizinhança da cultura com vastas áreas de pastagens, cujos capins também são hospedeiros de *M. fimbriolata* (Dinardo-Miranda 2003). Nos Estados do Nordeste, *Metarhizium anisopliae anisopliae* (Metsch.) Sorok. Deuteromycotina: Hyphomycetes) vem sendo utilizado com grande sucesso no controle da cigarrinha *M. posticata* (Stal 1854) (Hemiptera: Cercopidae) na cultura da cana-de-açúcar correspondendo a um dos mais bem sucedidos programas de controle biológico na América Latina (Alves 1998).

As diferentes condições climáticas do Estado de São Paulo, quando comparada aos estados produtores do Nordeste, e também a diferença de espécie predominante de cigarrinha, exigem estudos para avaliar e viabilizar um programa de controle microbiano por meio da utilização de *M. anisopliae*. Uma das etapas fundamentais para o estabelecimento de tal programa é a seleção de isolados do entomopatógeno. Loureiro *et al.* (2005) selecionaram, 8 isolados de *M. anisopliae* mais eficientes para o controle das ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *M. fimbriolata*, nas condições do Estado de São Paulo. O grau de virulência dos isolados de *M. anisopliae* em causar mortalidade em ninfas de *M. fimbriolata* pode variar com as condições edafoclimáticas de cada região e com a capacidade de susceptibilidade das populações dessa praga aos isolados. Como o Estado do Mato Grosso do Sul, principalmente, a região da Grande Dourados apresenta condições climáticas diferentes das encontradas nos estados de origem dos isolados, torna-se necessário um estudo visando selecionar isolados de *M.*

anisopliae adaptados às condições climáticas locais, tendo em vista que, de acordo com Almeida & Batista Filho (2001), a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de uma praga é uma das etapas mais importantes para a determinação da virulência, aspectos reprodutivos e produção em meio de cultura artificial, para a posterior utilização como bioinseticida, no intuito de aumentar a eficiência do programa de controle biológico dessa praga, em cultivos comerciais de cana-de-açúcar.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi selecionar isolados virulentos do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, em condições de laboratório, visando o controle de ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar na região da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Ciências Biológicas (FCBA) e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e em condições de campo, na Usina Dourados Álcool e Açúcar Ltda., localizada na zona rural do município de Dourados-MS, distrito de Itahum.

Estabelecimento da concentração dos fungos entomopatogênicos

Foram utilizados os isolados de *M. anisopliae* pertencentes ao Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),

Dourados-MS, armazenados em “freezer” a -12°C , na forma de conídios puros, acondicionados em “ependorfs”.

Inicialmente, foi realizado um bioensaio para estabelecimento da concentração a ser utilizada nos experimentos de seleção de isolados. Foi utilizado, como padrão, o isolado IBCB 425, por ser o inóculo de produção utilizado pela maioria das biofábricas e usinas paulistas até a presente data, para o controle da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, no Estado de São Paulo (Loureiro *et al.* 2005). Foram testadas cinco concentrações de *M. anisopliae* ($1,0 \times 10^9$; $0,5 \times 10^9$; $1,0 \times 10^8$; $0,5 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^7$ conídios/mL) e um tratamento testemunha em que as cigarrinhas foram apenas pulverizadas com água destilada estéril mais espalhante adesivo Tween[®] 80 a 0,1%.

As suspensões de conídios foram preparadas após a conidiogênese do fungo produzida em meio de cultura sólido BDA (batata-dextrose-ágar), com água destilada esterilizada e espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%. A contagem do número de conídios foi feita em câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

As ninfas da cigarrinha da raiz cana-de-açúcar foram coletadas em canavial na Usina Dourados Álcool e Açúcar Ltda. pertencente ao município de Dourados distrito de Itahum-MS, isenta de pulverizações com produtos fitossanitários químicos. Após coleta com pinça entomológica, as ninfas foram colocadas no interior de caixas de isopor contendo folhas de cana levadas e transportadas para o laboratório.

Cada bioensaio foi composto por cinco placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo uma folha de cana, lavada com água estéril, medindo 8 cm de comprimento e envolvida nas extremidades por um pedaço de algodão umedecido com água. A aplicação de 1 mL dos tratamentos foi feita sobre a folha de cana contendo as cigarrinhas, com o auxílio de uma micropipeta. As placas de Petri contendo os insetos

foram fechadas e mantidas em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, com fotofase de 12 horas e umidade relativa de $70\pm 10\%$ (Loureiro *et al.* 2005).

A concentração a ser utilizada nos experimentos subseqüentes foi aquela que causou porcentagem de mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu esporulação do fungo) superior a 70,0%, pela análise de Probit (Alves 1998) para obtenção dos valores de TL_{50} (conídios/mL), 5 dias após a pulverização, pelo padrão.

Foi avaliada a mortalidade diariamente. Cada inseto morto foi lavado em álcool 70% e água destilada esterilizada, para desinfestação superficial. Em seguida, os insetos foram transferidos para placas de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido, mantidas em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, com fotofase de 12 horas e umidade relativa de $70\pm 10\%$. Por meio deste procedimento é que se obteve a confirmação da mortalidade causada pelo patógeno, observando-se o crescimento micelial e conidiogênese no cadáver.

Para obtenção dos valores de TL_{50} (em dias) foi realizada análise de Probit para os diferentes tratamentos. Sobre as folhas de cana foram colocadas 10 ninfas de cigarrinhas perfazendo um total de 50 insetos por tratamento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 50 insetos por tratamento, divididos em 5 repetições (10 ninfas/repetição). Os dados referentes à mortalidade confirmada em laboratório foram analisados através da Análise de Regressão.

Seleção dos isolados de *Metarhizium anisopliae*

Baseado na concentração selecionada no experimento anterior foi realizado um bioensaio utilizando a metodologia descrita no item estabelecimento da concentração,

para testar a eficiência de 24 isolados de *M. anisopliae*. A seleção de isolados foi baseada na porcentagem de mortalidade confirmada de *M. fimbriolata*.

O experimento de seleção foi composto por cinco bioensaios contendo os diferentes isolados a uma concentração de 1×10^9 conídios/mL, um tratamento testemunha e o isolado padrão IBCB 425.

A mortalidade foi verificada diariamente durante o período de avaliação determinando-se a patogenicidade de cada isolado para o inseto. Os cadáveres foram observados e aqueles que apresentaram extrusão e reprodução do patógeno foram anotados e representaram a mortalidade confirmada. Os isolados que apresentaram porcentagem de mortalidade confirmada maior ou igual 70,0% até o sexto dia após a pulverização, mantida em câmara úmida, foram selecionados para a etapa de produção em arroz pré-cozido.

Foram coletados os dados de mortalidade confirmada, mortalidade total (mortalidade independente da causa) e mortalidade corrigida (calculada pela fórmula de Abbott 1925), para o 4^o, 6^o e 7^o dias após a inoculação. Os dados referentes à mortalidade confirmada foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$ e submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 50 insetos por tratamento, divididos em 5 repetições (10 ninfas/repetição).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento da concentração

Dentre as concentrações testadas houve diferença significativa entre a concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL e a concentração de $0,5 \times 10^9$ conídios/mL que

pôde ser observada através da análise de Probit (Tabela I). A concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL foi a mais patogênica às ninfas resultando em um menor tempo letal (TL_{50}) de 2,75 dias, valor este bastante expressivo, em relação as demais concentrações testadas. Essa concentração promoveu maior mortalidade de ninfas de *M. fimbriolata* dentre as demais concentrações testadas, diferentemente da concentração utilizada por Macedo *et al.* (2006), que foi de $5,0 \times 10^7$ conídios/mL. De maneira geral, os tempos letais foram decrescentes à medida que aumentou a concentração (Tabela I). Verificou-se ainda que não ocorreu diferença significativa entre as demais concentrações testadas, com base na sobreposição dos intervalos de confiança obtidos. Nessa avaliação foi verificada grande diferença no tempo letal da menor concentração (7,10 dias), quando comparado com o proporcionado pela maior concentração (2,75 dias) (Tabela I).

Por meio da análise de regressão, o número de insetos infectados mortos até o 5^o dia foi maior para a concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL (Figura I). Esta concentração foi superior àquela recomendada por Loureiro *et al.* (2005) para o controle das ninfas de *M. fimbriolata*, nas condições do Estado de São Paulo, os quais verificaram que o número de insetos infectados mortos até o 5^o dia foi maior para de $1,2 \times 10^7$ conídios/mL. Batista Filho *et al.* (2003) recomendaram a aplicação de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL em campo para os isolados IBCB 10, ESALQ 1037 e PL 43. Os resultados deste estudo estão acima dos encontrados por Almeida *et al.* (2004), que obtiveram nível de controle nas concentrações de $1,75 \times 10^5$ conídios/mL e dose de $1,75 \times 10^{12}$ conídios/ha. A divergência entre os resultados encontrados no presente trabalho e os disponíveis na literatura pode estar relacionada aos vários graus de tolerância verificados para os insetos em função de várias características fisiológicas relacionadas ao habitat em que vive a praga (Guagliumi 1972).

Segundo Futuyma (1992) muitas das características dos organismos são adaptações a seu ambiente. Grande parte da biologia, seja bioquímica, fisiologia ou ecologia consiste, na realidade, do estudo das adaptações. Algumas cigarrinhas das raízes que se apresentam tolerantes em uma região canavieira comportam-se melhor ou pior em outra região, dependendo das diferentes condições de clima, solo, umidade, temperatura, variedades de cana-de-açúcar.

Bioensaios de seleção de isolados

Nos experimentos ocorreram variação na mortalidade entre os isolados testados de 24,0 a 72,0% para a mortalidade total e de 2,6 a 53,3% para a mortalidade corrigida, após 4 dias da pulverização sobre as ninfas de *M. fimbriolata*, para os isolados UFGD 05 e UFGD 23, respectivamente (Tabela II). O aparecimento de insetos mortos ocorreu, principalmente, a partir do quarto dia da inoculação, o que corresponde ao segundo e terceiro dias após a fase de penetração, consequência das diferenças de população, alterações no tempo de manipulação do inseto e entre outros fatores (Alves 1998).

Macedo *et al.* (2006) relataram mortalidades corrigidas das ninfas de *M. fimbriolata* variando entre 10,5 a 60,0%, cinco dias após a inoculação. Os mais patogênicos foram IBCB 384, IBCB 348, ESALQ 1285, IBCB 345, ESALQ 319 e ESALQ 1037 que causaram mortalidades médias de 59,7; 59,5; 57,9; 58,4; 53,9 e 46,5%, respectivamente, valores estes pelos autores foram semelhantes aos encontrados no presente estudo. O isolado IBCB 374 e IBCB 348 provocaram mortalidade média de 47,7 e 58,4%, respectivamente (Macedo *et al.* 2006) e no presente estudo, os mesmos isolados causaram 42,0 e 52,0%, respectivamente (Tabela II). Esta variação da patogenicidade é observada com certa frequência em bioensaios de seleção, podendo

estar associada a fatores como baixa virulência do isolado, especificidade e tolerância do hospedeiro (Alves 1998).

A mortalidade de *M. anisopliae* variou de 90,0 a 100,0% (mortalidade total) e 55,0 a 85,7% (mortalidade corrigida) aos seis dias da inoculação sobre as ninfas de *M. fimbriolata* para os isolados CG 423 e UFGD 18, respectivamente (Tabela II). Loureiro *et al.* (2005) obtiveram variação na patogenicidade de 66,0 a 100,0% (mortalidade total) e 0 a 100,0% (mortalidade corrigida) aos seis dias da inoculação sobre as ninfas de *M. fimbriolata* coletadas no Estado de São Paulo. Aos sete dias da inoculação sobre as ninfas, ocorreu variação de 92,0 a 100,0% para a mortalidade total e 63,6% a 100,0% para a mortalidade corrigida dentre os isolados testados. O isolado IBCB 425 utilizado como padrão nos bioensaios de seleção apresentou ao sexto dia da aplicação variações de mortalidade total e corrigida de 96,0 a 100,0% e 12,8 a 75,0%, respectivamente. Este isolado é aplicado contra ninfas da cigarrinha da raiz em cana-de-açúcar, com corte mecanizado, proporcionando altos níveis de controle quando comparado aos resultados observados pelos produtos fitossanitários químicos, e está sendo produzido em escala comercial pela maioria das biofábricas e usinas do País.

Nos testes de patogenicidade com *M. fimbriolata* observou-se grande variação na porcentagem de mortalidade para os 24 isolados provenientes de diferentes hospedeiros e região, evidenciando a existência de variabilidade genética em relação a esse parâmetro. A grande variabilidade genética presente em fungos entomopatogênicos (Alves 1998) pode ser um dos principais fatores responsáveis pelas diferenças de virulência entre isolados e espécies, como referido por Diehl-Fleig *et al.* (1988). Essa variação tem sido identificada em outros caracteres além da patogenicidade que incluem a dimensão dos conídios, taxas de crescimento e atividades enzimáticas (St. Leger *et al.* 1992).

A mortalidade total na testemunha variou de 22,0 a 40,0%, após 4 dias da pulverização, dados estes superiores aos encontrados por Macedo *et al.* (2006) em experimentos nos quais foram fornecidas raízes de mudas de cana-de-açúcar como substrato para as ninfas, em que a mortalidade da testemunha, aos cinco dias após a inoculação foi inferior a 20%. Os valores de mortalidade total observados por esses autores, para o tratamento testemunha, ocorreram provavelmente, em função do nicho ecológico das ninfas que são radicícolas desenvolvendo-se sugando as raízes superficiais ou profundas no solo como sugerido por Mendonça (2005), diferentemente da metodologia utilizada no presente trabalho. Essa suposição corrobora com os resultados obtidos por Macedo *et al.* (2006) que fornecendo folhas de cana-de-açúcar como alimento para as ninfas obtiveram, na testemunha mortalidade acima de 50,0%, quatro dias após a inoculação. O mesmo foi observado por Loureiro *et al.* (2005) quando utilizaram esta metodologia, os quais obtiveram mortalidades de até 90,0% na testemunha, seis dias após a inoculação.

Deve-se levar em consideração que o objetivo do controle microbiano, como em qualquer programa de controle biológico, não deve ser a total eliminação da população da praga, pois, sendo ela um componente do agroecossistema, sua presença, em níveis abaixo do nível de dano econômico, pode ser benéfica para a manutenção dos predadores, parasitóides e patógenos já presentes na área (Sosa-Gómez; Pereira; Alves 1998).

A mortalidade pelo fungo pôde ser confirmada pelo exame das ninfas contaminadas que foram mantidas em câmara úmida após a morte, observando-se a completa colonização do fungo e sua posterior esporulação. No grupo de ninfas em que foi aplicado apenas o veículo das suspensões de conídios (testemunha), não ocorreu esporulação dos fungos sobre os cadáveres das ninfas, indicando que a mortalidade

ocorrida nesse tratamento não foi resultado da infecção pelo fungo (Loureiro & Monteiro 2005).

Dentre os 24 isolados de *M. anisopliae* avaliados, os isolados UFGD 425, UFGD 22, PL 43, IBCB 348, UFGD 28, UFGD 05 e UFGD 03 foram mais patogênicos, causando porcentagem de mortalidade confirmada das ninfas após o sétimo dia da inoculação de 84,0; 82,0; 78,0; 76,0; 76,0; 74,0; 70,0%, respectivamente, mostrando potencialidade como agentes de controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar (Tabela III). Segundo Alves *et al.* (1998) o isolado PL 43 é o mais utilizado no nordeste do Brasil para o controle de cigarrinha da folha *M. posticata* naquela região, demonstrando a facilidade de adaptação desse microrganismo que, para ser mais eficiente, não necessita ser aplicado no mesmo local de onde foi isolado (Almeida *et al.* 1997). A virulência e especificidade ao hospedeiro são duas características importantes para a seleção de um microrganismo a ser usado no controle microbiano (Devi *et al.* 2001). Quatro isolados causaram mortalidade confirmada entre 71,0 a 80,0% e dois isolados causaram mortalidade entre 81,0 a 90,0% decorridos sete dias da pulverização sobre as ninfas de *M. fimbriolata* (Figura II). Loureiro *et al.* (2005) relataram que até o 4^o dia a mortalidade confirmada máxima obtida pelos isolados variou de 61,0 a 70,0%, enquanto que para o 6^o dia, a mortalidade confirmada máxima foi ao redor de 81,0 a 90,0%.

Os resultados obtidos evidenciam a importância de efetuar bioensaios para a seleção de isolados antes do desenvolvimento de um produto microbiano. Esses bioensaios devem avaliar também a virulência das raças e dos patógenos visando selecionar, os que apresentem maior virulência, patogenicidade e que possam ser produzidos em meios artificiais (Alves 1998).

Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de mestrado, pelo financiamento do projeto e a Usina Dourados Açúcar e Álcool Ltda. pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology, College Park, 18:** 265-267.

Almeida, J.E.M.; S.B. Alves; R.M. Pereira. 1997. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). **Journal of Applied Entomology 121:** 539-543. In: A. Batista Filho; J. E. M. Almeida; A. S. Santos; L. A. Machado; S. B. Alves. 2003. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico 70:** 309-314.

Almeida, J. E. M. & A. Batista Filho. 2001. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 20:** 30-33.

Almeida, J.E.M.; A. Batista Filho; A. Santos. 2004. Controle da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*, com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. **Revista STAB – Açúcar, Álcool Subprodutos 22:** 42-45.

Alves, S. B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p.289-381. In: S. B. Alves (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, xi+1163 p.

Alves, S. B.; J. R. S. Lopes; L. F. A. Alves & A. Moino Júnior. 1998. Controle microbiano de artrópodos associados a doenças de plantas. In: I. S. Melo & J. L. Azevedo. **Controle biológico 1**: 143-170.

Batista Filho, A.; J. E. M. Almeida; A. S. Santos; L. A. Machado; S. B. Alves. 2003. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (HOM.: CERCOPIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico 70**: 309-314.

Devi, K. U.; J. Padmavathi; H. C. Sharma; N. Seetharama. 2001. Laboratory evaluation of the virulence of *Beauveria bassiana* isolates to the sorghum shoot borer *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) and their characterization by RAPD-PCR. **World Journal of Microbiology & Biotechnology 17**: 131-137. In: D. Macedo; S. B. Alves; S. A. Vieira. 2006. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Ciências Agrárias 27**: 47-52.

Diehl-Fleig, E.; M. E. Silva; M. R .M. Pacheco. 1988. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura 40**: 1103-1105.

Dinardo-Miranda, L. L. 2003. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 72p.

Dinardo-Miranda, L. L., J. M. G. Ferreira, A. M. P. R. Durigan & V. Barbosa. 2000. Eficiência de inseticidas e medidas culturais no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos 18**: 34-36.

Dinardo-Miranda, L. L., P. Figueiredo, M. G. A. Landell, J. M. G. Ferreira & P. A. M. Carvalho. 1999. Danos causados pelas cigarrinhas das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos 17**: 48-52.

Dinardo-Miranda, L. L., V. Garcia & V. Parazzi. 2002. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos, na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology 31**: 609-614.

Embrapa. 2008. Disponível em: <<http://manual.sct.embrapa.br/editorial/default.jsp>>.

Acesso em: 20 Jul. 2009.

Furlani Neto, V. L. 1995. Colhedora de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) avaliação em canaviais com e sem queima prévia. 105f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Futuyma, D. J. 1992. O contexto ecológico da mudança evolutiva, p.20-44. In: D. J. Futuyma (ed.). **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto. 631p.

Guagliumi, P. 1972. Pragas da Cana-de-açúcar – Nordeste do Brasil. (Coleção Canavieira, 10). Rio de Janeiro, Instituto do Açúcar e do Alcool, I-V + 622p.

Loureiro, E. S.; A. Batista Filho; J. E. M. Almeida; L. G. A. Pessoa. 2005. Seleção de Isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology 34**: 791-798.

Loureiro, E. S; A. C. Monteiro. 2005. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). **Revista Árvore 29**: 553-561.

Macedo, D.; S. B. Alves; S.A. Vieira. 2006. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Ciências Agrárias 27**: 47-52.

Mendonça, A. F. 2005. **Cigarrinhas da cana-de-açúcar: controle biológico**. Maceió: Insecta, 317 p.

Sosa-Gómez, D. R.; R. M. Pereira; S. B. Alves. 1998. Impacto ambiental de entomopatógenos, cap.37, p.1075-1095. In: S. B. Alves (ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, xi+1163 p.

St. Leger, L. J.; B. May; L. L. Allee; D. C. Frank; R. C. Staples; D. W. Roberts. 1992. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** **60**: 89-101. In: D. Macedo; S. B. Alves; S. A. Vieira. 2006. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). **Ciências Agrárias** **27**: 47-52.

Tabela I: Tempos letais medianos (TL₅₀) em dias, intervalos de confiança (IC) (P<0,05), equações de regressão linear e valores de x² obtidos pela análise de Probit, para o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sobre *Mahanarva fimbriolata*.

Isolado IBCB 425	TL ₅₀	IC	Equação	X ²
1,0 x 10 ⁹ conídios/mL	2,75	(2,52; 3,00)	Y= 3,81 + 2,68.logx	0,12
0,5 x 10 ⁹ conídios/mL	4,09	(2,42; 6,90)	Y= 3,58 + 2,31.logx	1,46
1,0 x 10 ⁸ conídios/mL	4,26	(2,59; 7,00)	Y= 3,66 + 2,12.logx	1,03
0,5 x 10 ⁸ conídios/mL	5,30	(2,85; 9,85)	Y= 2,61+ 3,29.logx	1,62
1,0 x 10 ⁷ conídios/mL	7,10	(3,52; 14,32)	Y= 2,74 + 2,64.logx	0,71

Figura I. Mortalidade (%) das ninfas de *Mahanarva fimbriolata* cinco dias após aplicação com *Metarhizium anisopliae* (isolado IBCB 425), nas concentrações de 1 x 10⁷, 0,5 x 10⁸ e 1 x 10⁸, 0,5 x 10⁹, 1,0 x 10⁹ conídios/mL (25±1°C, fotofase de 12 horas e 70±10% UR).

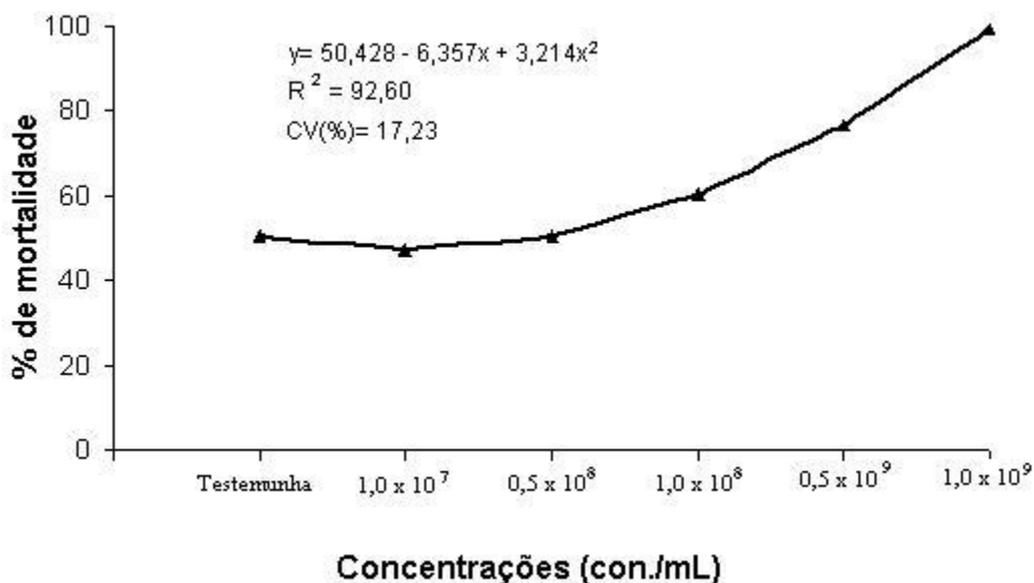


Tabela II. Média da mortalidade acumulada (total e corrigida) (%) no 4^o, 6^o e 7^o dias após a inoculação de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (25±1 °C, fotofase de 12 horas e 70±10% UR).

1º Bioensaio	4 dias após a inoculação		6 dias após a inoculação		7 dias após a inoculação	
Isolados	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida
Testemunha	22,0	0,0	96,0	0,0	96,0	0,0
IBCB 425	32,0	12,8	100,0	12,8	100,0	100,0
IBCB 376	46,0	30,8	100,0	30,8	100,0	100,0
IBCB 410	34,0	15,4	100,0	15,4	100,0	100,0
PL 49	34,0	15,4	100,0	15,4	100,0	100,0
CG 863	48,0	33,3	100,0	33,3	100,0	100,0
UFGD 05	24,0	2,6	100,0	2,6	100,0	100,0
2º Bioensaio	4 dias após a inoculação		6 dias após a inoculação		7 dias após a inoculação	
Isolados	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida
Testemunha	30,0	0,0	78,0	0,0	78,0	0,0
IBCB 425	50,0	28,6	98,0	75,0	98,0	90,9
IBCB 374	42,0	17,1	96,0	50,0	96,0	63,6
PL 43	40,0	14,3	100,0	85,0	100,0	100,0
CG 423	54,0	34,3	90,0	55,0	90,0	54,5
UFGD 03	44,0	20,0	100,0	75,0	100,0	100,0
UFGD 07	58,0	40,0	92,0	50,0	92,0	63,6
3º Bioensaio	4 dias após a inoculação		6 dias após a inoculação		7 dias após a inoculação	
Isolados	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida
Testemunha	30,0	0,0	80,0	0,0	80,0	0,0
IBCB 425	46,0	11,5	96,0	30,0	96,0	80,0
IBCB 104	60,0	38,5	96,0	10,0	96,0	80,0
IBCB 403	46,0	19,2	100,0	60,0	100,0	100,0
IBCB 408	58,0	19,2	100,0	20,0	100,0	100,0
UFGD 12	44,0	30,8	94,0	50,0	94,0	70,0
UFGD 17	36,0	15,4	100,0	70,0	100,0	100,0

4° Bioensaio	4 dias após a inoculação		6 dias após a inoculação		7 dias após a inoculação	
Isolados	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida
Testemunha	26,0	0,0	84,0	0,0	84,0	0,0
IBCB 425	52,0	35,1	98,0	70,0	98,0	87,5
IBCB 348	52,0	35,1	94,0	30,0	94,0	62,5
IBCB 373	52,0	35,1	98,0	70,0	98,0	87,5
UFGD 20	46,0	27,0	94,0	20,0	94,0	62,5
5° Bioensaio	4 dias após a inoculação		6 dias após a inoculação		7 dias após a inoculação	
Isolados	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida	Mortalidade Total	Mortalidade Corrigida
Testemunha	40,0	0,0	96,0	0,0	48,0	0,0
IBCB 425	42,0	13,3	100,0	42,9	100,0	100,0
UFGD 18	42,0	3,3	100,0	85,7	100,0	100,0
UFGD 19	48,0	13,3	100,0	57,1	100,0	100,0
UFGD 22	58,0	30,0	100,0	14,3	100,0	100,0
UFGD 23	72,0	53,3	100,0	14,3	100,0	100,0
UFGD 28	42,0	3,3	100,0	42,9	100,0	100,0

n=50 insetos

Tabela III. Média da mortalidade acumulada confirmada (%) dos isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em ninfas de *Mahanarva fimbriolata*, após sete dias da pulverização ($25\pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12 horas e $70\pm 10\%$ UR).

CG 423	22,0 b
UFGD 12	24,0 b
UFGD 17	24,0 b
UFGD 20	26,0 b
IBCB 104	30,0 b
IBCB 408	32,0 b
PL 49	36,0 b
UFGD 07	36,0 b
IBCB 410	36,0 b
IBCB 374	36,0 b
CG 863	48,0 b
IBCB 403	54,0 a
UFGD 19	58,0 a
UFGD 23	60,0 a
IBCB 373	60,0 a
IBCB 376	64,0 a
UFGD 18	66,0 a

UFGD 03	70,0 a
UFGD 05	74,0 a
UFGD 28	76,0 a
IBCB 348	76,0 a
PL 43	78,0 a
UFGD 22	82,0 a
IBCB 425	84,0 a
CV (%)	44,31

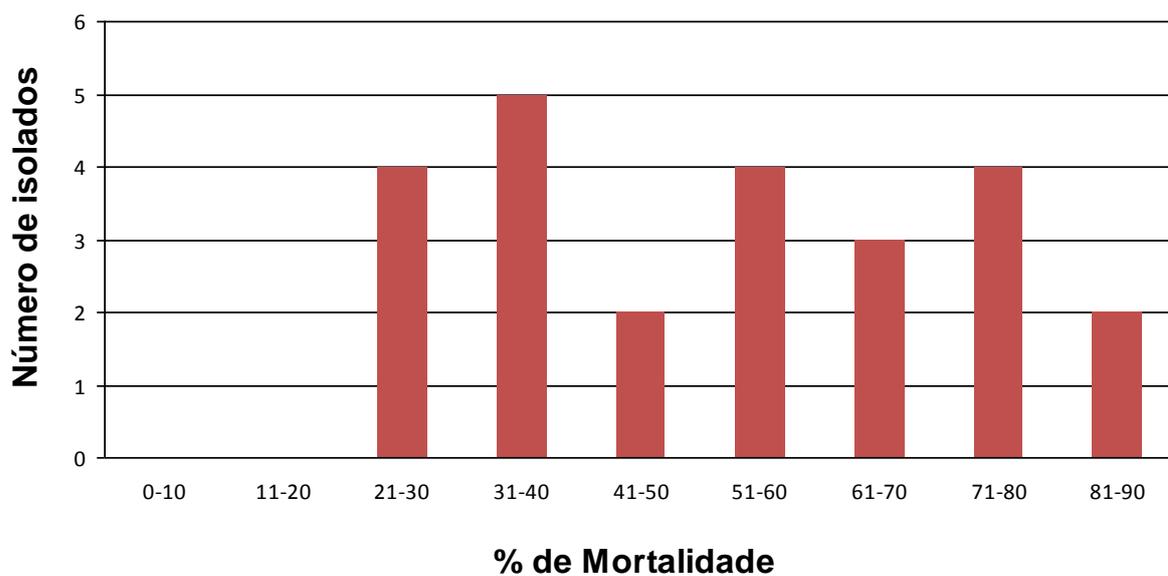


Figura II. Distribuição de freqüência de isolados de *Metarhizium anisopliae* em relação à mortalidade confirmada causada em ninfas de *Mahanarva fimbriolata*, após sete dias da pulverização.

Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) cultivados em arroz.

Alessandra Fequetia Freitas¹ & Elisângela de Souza Loureiro^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Dourados-MS. lezinhafreitas@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) Campus de Chapadão do Sul (CPCS), Antiga estrada da Fazenda Campo Bom, Caixa Posta 112, Chapadão do Sul-MS; lis_loureiro@yahoo.com.br; autor correspondente

Yield and germination of conidia of different isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) grown on rice.

ABSTRACT

In order to determine the production and viability of different isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes), were placed 100 g of rice pre-cooked in polypropylene bags measuring 35 cm long and 22 cm wide, which were immediately autoclaved at 120 °C for 25 min. After cooling, the rice was inoculated with 1 mL of a suspension containing 1.0×10^9 conidia/mL, packed an incubator at 25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ RH and 12h photophase. Plastic bags containing rice+fungus were incubated for 10 days. After this period, rice+fungus was packed in

plastic trays to promote conidia of the fungus, within the climatic chamber at 25 ± 1 °C, $70\pm 10\%$ RH and 12h photophase. The trays were stacked in 4 days, crossing them for another 4 days. IBCB 425 isolate was the most produced conidia on rice with 1.82×10^9 conidia/g rice pre-cooked by the tray method. Regarding the viability of the isolates, the IBCB 425 also showed a higher germination of conidia, with 94.84%.

KEYWORDS. Insecta, Microbial control, Entomopathogenic fungi.

RESUMO

Com o objetivo de determinar a produção e a viabilidade de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes), foram colocadas 100 g de arroz pré-cozido em sacos de polipropileno medindo 35 cm de comprimento e 22 cm de largura, os quais foram imediatamente autoclavados a 120 °C, por 25 min. Após o resfriamento do arroz, inoculou-se 1 mL de uma suspensão contendo $1,0 \times 10^9$ conídios/mL, sendo acondicionados em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, $70\pm 10\%$ de UR e fotofase de 12h. Os sacos plásticos contendo arroz + fungo foram incubados por 10 dias. Decorrido esse período, o arroz+fungo foi acondicionado em bandejas plásticas para promover a conidiogênese do fungo, dentro da câmara climática a 25 ± 1 °C, $70\pm 10\%$ de UR e fotofase de 12h. As bandejas ficaram empilhadas por 4 dias, cruzando-as por mais 4 dias. O isolado IBCB 425 foi o que mais produziu conídios em arroz com $1,82 \times 10^9$ conídios/g de arroz pré-cozido pelo método de bandeja. Com relação à viabilidade dos isolados, o IBCB 425 também apresentou maior capacidade de germinação dos conídios, com 94,84%.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, Controle microbiano, Fungos entomopatogênicos.

INTRODUÇÃO

A colheita de cana-de-açúcar sem queima previa favoreceu a incidência da cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae). Não havendo queima da palhada, ocorre um acúmulo desse material no solo e um aumento da umidade facilitando assim o crescimento e a disseminação dessa praga (Batista Filho *et al.* 2003) que atualmente se tornou uma das mais importantes, economicamente, para a cana-de-açúcar, sendo encontrada em altas populações em praticamente todas as regiões de São Paulo especialmente nas regiões mais quentes e úmidas causando danos significativos à cultura, por reduzir a produtividade agrícola e a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar, utilizada como matéria prima na indústria (Dinardo-Miranda *et al.* 1999, 2000, 2002).

Situação semelhante encontra-se nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, onde é comum a ocorrência de altas infestações da cigarrinha da raiz em cana planta e soqueiras de cana queimada, devido à vizinhança da cultura com vastas áreas de pastagens, cujos capins também são hospedeiros de *M. fimbriolata* (Dinardo-Miranda 2003).

Os danos provocados por *M. fimbriolata* ocorrem tanto na fase de ninfa como de adulto. As ninfas, através de picadas nas raízes, provocam danos aos vasos condutores impedindo o fluxo de água e de nutrientes. Os adultos provocam danos nas folhas injetando toxinas que prejudicam sensivelmente a capacidade de fotossíntese das plantas (Garcia *et al.* 2007). O que caracteriza a presença do inseto no canavial é a grande quantidade de espuma branca na base da touceira envolvendo ninfas (Azzi; Dodson 1971).

O controle microbiano com a aplicação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) tem tido

sucesso com as cigarrinhas das raízes, uma vez que a espuma produzida pelas ninfas proporciona uma condição favorável ao crescimento do fungo. Além disso, outras características desejáveis para esse patógeno ser efetivo como produto comercial devem ser consideradas. Entre as características pode-se destacar a facilidade de produção e aplicação, especificidade e a ausência de toxicidade, além de permitir a associação destes organismos com outras táticas de controle, viabilizando sua utilização em grandes áreas (Alves 1998).

A produção, em larga escala no Brasil do fungo *M. anisopliae* teve início na região dos canaviais nordestinos, objetivando o controle biológico da cigarrinha da folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* Stal, 1855 (Hemíptera: Cercopidae) (Pereira; Eira 1999) e vem sendo produzido e comercializado com grande sucesso correspondendo a um dos mais bem sucedidos programas de controle biológico na América Latina (Alves *et al.* 1998; Alves *et al.* 2008).

As técnicas de produção de fungos para controle de pragas devem ter baixo custo e permitir a obtenção de alta concentração de formas viáveis e virulentas do patógeno, que possam ser formuladas e utilizadas (Loureiro *et al.* 2005). A facilidade de produção em larga escala viabiliza a utilização destes agentes de maneira inundativa (Alves & Pereira 1998). O sistema para a produção de *M. anisopliae* que algumas biofábricas e usinas de açúcar e álcool no Brasil utilizam é o desenvolvido por Alves & Pereira (1989) conhecido pelo método de bandeja.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção e a viabilidade dos isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, selecionados em laboratório, para o controle de ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar no Estado de Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Produção de isolados em arroz

Foram utilizados os isolados de *M. anisopliae* IBCB 348 (isolado de *M. fimbriolata*), IBCB 425 (isolado de lagarta), PL 43 (isolado de *M. posticata*), UFGD 03 (isolado de *M. fimbriolata*), UFGD 05 (isolado de *Zulia entreriana*), UFGD 22 (isolado de *M. fimbriolata*) e UFGD 28 (isolados de *Deois flavopicta*), os quais foram mais virulentos às ninfas de *M. fimbriolata*, apresentando mortalidade confirmada acima de 70,0%, determinada em ensaio anterior.

Esses isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) as quais foram incubadas durante dez dias em câmara climatizada BOD a temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, para promover o crescimento e esporulação do fungo. Após 10 dias, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça metálica e então preparada uma suspensão contendo $1,0 \times 10^9$ conídios/mL com água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80[®]) a 0,1%.

Inicialmente, foi realizado o cozimento do arroz por cerca de 15 minutos, até que este apresentasse a textura “emborrachada”, sendo em seguida colocado em bandejas. Após o resfriamento foram colocadas 100g de arroz em sacos de plástico de polipropileno (35cm de comprimento x 22 cm de largura), os quais foram fechados com grampos de metal, autoclavados por 25 minutos a 120 °C, e resfriados em condição ambiente.

Foi utilizado uma seringa descartável para perfurar o saco plástico e inocular 1mL da suspensão de conídios com $1,0 \times 10^9$ conídios/mL de cada isolado de *M. anisopliae*. O orifício foi fechado com uma etiqueta adesiva e agitando-se o saco plástico para uma distribuição uniforme dos conídios nos grãos de arroz. Após a inoculação, os sacos foram acondicionados, por 10 dias, em câmara climatizada a temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, para a germinação dos conídios e crescimento do fungo sobre o arroz. Foram realizadas observações diárias avaliando-se, visualmente, a presença ou ausência de eventuais contaminantes. Para cada isolado foram utilizados 12 sacos plásticos contendo arroz inoculado.

Decorrido este período, foram selecionados, para cada isolado, seis sacos não contaminados com crescimento uniforme de micélio e os seus conteúdos transferidos, cada um, para uma bandeja plástica de 46 cm de comprimento, 30 cm de largura e 11 cm de altura. As bandejas foram mantidas empilhadas dentro da câmara climatizada nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente por 8 dias. No quarto dia foram cruzadas as bandejas empilhando-as, permitindo assim uma circulação de ar entre elas, conseqüentemente uma secagem mais rápida do arroz com fungo. Decorridos os 8 dias, o material contido na bandeja foi colocado em sacos plásticos, totalizando 6 sacos plásticos para cada isolado, que serviram como repetição e foram armazenados em geladeira (4 °C) (Alves & Pereira 1989).

Para exame da concentração dos conídios foram retirados, ao acaso, 6 amostras de 1 grama de arroz com fungo a uma profundidade de 1,5 cm de cada bandeja, adicionando-se a mesma 10 mL de água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80[®]) a 0,1%, para a preparação de uma suspensão de conídios. A suspensão foi agitada por um minuto em agitador tipo vórtex para promover a desagregação e homogeneização dos

conídios. Em seguida, as amostras foram diluídas em série e quantificada em câmara de Neubauer, com auxílio do microscópio óptico com aumento de 400x. Dessa forma, foi possível determinar o número de conídios produzidos por grama para cada isolado (Alves & Pereira 1998).

Para avaliação da viabilidade, foram retirados, ao acaso, duas amostras de 1 grama de arroz com fungo de cada bandeja e, para cada amostra, foram preparadas 4 placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) inoculado com os deferentes isolados do fungo, totalizando 8 placas por isolado. As placas foram incubadas por 20 horas a $26\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e 12 horas de fotofase. Em seguida cada placa foi dividida em 4 quadrantes. Foi quantificado o número de conídios germinados e não germinados, dos quadrantes, em microscópio óptico com objetiva de 400x (Alves *et al.* 1998).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 6 repetições. Os valores de produção e da viabilidade dos conídios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados dos valores de produção foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$ e os de viabilidade para arsen $(x/100)^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção em meio de arroz pré-cozido

Os isolados IBCB 425 e IBCB 348 foram os mais produtivos, não diferindo estatisticamente entre si, com rendimentos de $1,82 \times 10^9$ e $1,75 \times 10^9$ conídios/grama de arroz, respectivamente (Tabela I). Esses dados são superiores aos encontrados por

Loureiro *et al.* (2005) que obtiveram rendimento de $2,30 \times 10^8$ e $2,08 \times 10^8$ conídios/grama de arroz, para os isolados IBCB 425 e IBCB 348, respectivamente.

Os isolados UFGD 28 e UFGD 22 diferiram estatisticamente dos isolados UFGD 03, UFGD 05 e PL 43, obtendo rendimento de $1,58 \times 10^9$ e $1,56 \times 10^9$ conídios/grama de arroz, respectivamente (Tabela I). Alves & Pereira (1989) utilizando o mesmo processo, obtiveram um rendimento em conídios menor, com produção de até $8,8 \times 10^8$ conídios/g.

Segundo Alves & Pereira (1998), para *M. anisopliae*, o rendimento pode chegar até 11% de conídios em relação ao peso de arroz utilizado na produção. Em escala industrial, médias de rendimento em torno de 9% são mais prováveis.

Embora o isolado do fungo IBCB 348 seja o ingrediente ativo de algumas biofábricas de fungos entomopatogênicos do País, Macedo (2005) demonstrou que a produção de conídios do isolado ESALQ 1037, pelo método de bandeja, diferiu estatisticamente da produção de conídios do isolado IBCB 348 nas mesmas condições. O isolado ESALQ 1037 apresentou maior produção, $3,49 \times 10^9$ conídios/grama de arroz, enquanto que o IBCB 348 apresentou $2,29 \times 10^9$ conídios/grama de arroz. Neves (1998) selecionando isolados para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) não obteve diferença significativa entre o isolado E 9 com rendimento de $1,54 \times 10^9$ conídios/g de arroz + fungo e os isolados ESALQ 1037, ESALQ 1097 com rendimento de $3,37 \times 10^9$ e $1,04 \times 10^9$ conídios/g, respectivamente.

Essa diferença no rendimento depende não só do isolado usado como da sua adaptação ao método de produção. Também pode estar relacionado com o teor de umidade, variação na temperatura da sala de incubação, diferentes condições de armazenamento, níveis de contaminação, vigor do isolado, as variedades de arroz e tempo de cozimento do arroz (Alves 1998). O acúmulo de proteína bruta em certas

variedades de arroz pode ser o fator responsável pela diferença no rendimento de conídios, como observado para os isolados selecionados no presente trabalho quando comparados em outros experimentos. Segundo Araújo *et al.* (2003) esse teor de proteína bruta ainda pode variar para as mesmas variedades quando submetidas a diferentes condições ambientais.

Assim como em experimentos realizados no Estado de São Paulo, os resultados encontrados no presente trabalho, quanto à avaliação da produção e viabilidade, o isolado IBCB 425 de *M. anisopliae*, em laboratório, foi bastante promissor, apresentando um bom rendimento de conídios/grama de arroz esporulado. Esse isolado desde 2004 está sendo produzido em escala comercial pela maioria das biofábricas e usinas do País (J. M. Almeida, 2009 - dados não publicados).

Quanto à viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*, o IBCB 425 apresentou maior porcentagem de germinação (94,84%). Os isolados UFGD 22, IBCB 348 e UFGD 28 apresentaram, respectivamente, 89,18; 89,46; 90,00% de germinação (Tabela I). Esses valores foram inferiores aos encontrados por Loureiro *et al.* (2005), sendo observada a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* para os isolados IBCB 425 e IBCB 348 de 99,33 e 99,29%, respectivamente.

O poder germinativo dos esporos é visivelmente influenciado, em caráter negativo, pelo aumento de manipulação, o que implica em que a viabilidade dos esporos é alterada em função do tipo de preparo do fungo. Os baixos níveis de germinação em “arroz + esporos” moído em relação ao “arroz + esporos” são uma consequência da operação de moagem, a excessiva manipulação da matéria-prima e o aquecimento do moinho acarretam prejuízos aos esporos (Cruz *et al.* 1985).

Batista Filho *et al.* (2003) observaram que o controle de *M. fimbriolata* com *M. anisopliae* é influenciado pelos isolados utilizados, sendo que em experimento

realizado, ficou evidente que houve diferenças entre os isolados produzidos, sendo apenas o IBCB 425 o que mais produziu conídios em arroz pelo método de bandeja e também o que apresentou maior capacidade de germinação em relação aos demais isolados testados.

Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de mestrado, pelo financiamento do projeto e a Usina Dourados Açúcar e Álcool Lda. pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, S. B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p.289-381. In: S. B. Alves (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, xi+1163 p.

Alves, S. B.; J. R. S. Lopes; L. F. A. Alves & A. Moino Júnior. 1998. Controle microbiano de artrópodos associados a doenças de plantas. In: I. S. Melo & J. L. Azevedo. **Controle biológico 1**: 143-170.

Alves, S. B.; J. R. S. Lopes; S. A. Vieira & M. A. Tamai. 2008. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina, p.71-103. In: S. B. Alves & R. B. Lopes (ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. FEALQ, Piracicaba, viii+414p.

Alves, S. B. & R. M. Pereira. 1989. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. **Ecosistema 14**: 188-192.

Alves, S. B & R. M. Pereira. 1998. Produção de fungos entomopatogênicos, p. 845-869. In: S. B. Alves (ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, xi+1163 p.

Araújo, E. S.; S. R. Souza; M. S. Fernandes. 2003. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 38**: 1281-1288.

Azzi, G. M.; A. K. Dodson. 1971. Infestação de cigarrinha da raiz em canaviais de Piracicaba – SP (*Mahanarva fimbriolata* Stal). **Brasil Açucareiro 77**: 36-42.

Batista Filho, A.; J. E. M. Almeida; A. S. Santos; L. A. Machado; S. B. Alves. 2003. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (HOM.: CERCOPIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico 70**: 309-314.

Cruz, B. P. B.; O. C. Abreu; P. J. Valarini; D. A. Oliveira. 1985. Efeito da temperatura, tempo de armazenagem e do tipo de preparo, sobre o poder germinativo de esporos de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, cultivado em arroz. **Arquivos do Instituto Biológico 52**: 45-57.

Dinardo-Miranda, L. L. 2003. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 72p.

Dinardo-Miranda, L. L., J. M. G. Ferreira, A. M. P. R. Durigan & V. Barbosa. 2000. Eficiência de inseticidas e medidas culturais no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos 18**: 34-36.

Dinardo-Miranda, L. L., P. Figueiredo, M. G. A. Landell, J. M. G. Ferreira & P. A. M. Carvalho. 1999. Danos causados pelas cigarrinhas das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos 17**: 48-52.

Dinardo-Miranda, L. L., V. Garcia & V. Parazzi. 2002. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos, na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology 31**: 609-614.

Garcia, J. F.; E. Grisoto; P. S. M. Botelho; J. R. P. Parra; B. Appezzato-da-Glória. 2007. Feeding site of the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. **Scientia Agrícola 64**: 555-557.

Loureiro, E. S.; A. Batista Filho; J. E. M. Almeida; L. G. A. Pessoa. 2005. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854). **Arquivos do Instituto Biológico 72**: 469-472.

Macedo, D. 2005. Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (HEMIPTERA: CERCOPIIDAE) em cana-de-açúcar. Piracicaba, SP, 87 p. Tese (Doutorado). Esalq/USP.

Neves, P. M. J. 1998. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera, Termitidae). Piracicaba, SP, 113p. Tese (Doutorado) Esalq/USP.

Pereira, S. R. M.; A. F. Eira. 1999. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN em cultivo submerso: Esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. **Ciência Rural** 29: 389-394.

Tabela I. Produção média de conídios/grama de arroz esporulado e viabilidade de isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (T=25±1 °C; UR= 70±10%; fotofase de 12 horas).

Tratamentos	Produção de conídios ($\times 10^9$) ^(1, 2)	Viabilidade (%) ^(1, 3)
PL 43	1,11 d	85,46 c
UFGD 05	1,37 c	80,87 d
UFGD 03	1,41 c	85,87 c
UFGD 22	1,56 b	89,18 b
UFGD 28	1,58 b	90,00 b
IBCB 348	1,75 a	89,46 b
IBCB 425	1,82 a	94,84 a
CV (%)	23,29	6,48

¹ Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Scott- Knott.

² Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

³ Dados transformados em $\text{arsen}(x/100)^{1/2}$.

CONCLUSÕES

A concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL de *M. anisopliae* provocou efeito letal em menor tempo do que as demais concentrações testadas;

O fungo *M. anisopliae* é patogênico para ninfas de *M. fimbriolata*; Os isolados apresentaram diferentes níveis de patogenicidade para ninfas de *M. fimbriolata*;

O isolado IBCB 425 foi o que mais produziu conídios em arroz pelo método de bandeja e apresentou maior capacidade de germinação dos conídios.