

## BIOLOGICAL CONTROL

### Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Contra a Broca Gigante da Cana-de-Açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae)

MARIA DE F. DE S. FIGUEIRÊDO<sup>1</sup>, EDMILSON J. MARQUES<sup>1</sup>, RICARDO O.R. DE LIMA<sup>2</sup> E JOSÉ V. DE OLIVEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. Agronomia - Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE

<sup>2</sup>Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina. Rua Ângela Cristina C. Pessoa de Luna S/N, Bairro Novo, 55810-000, Carpina, PE

Screening of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Isolates Against the Giant Borer of Sugarcane *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae)

**ABSTRACT** - Isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. were tested against *Castnia licus* (Drury) larvae, collected from Tabu Distillery sugar cane fields, in Caaporã-PB. The isolates code 645, 604, 512, 447, IPA 205, IPA 202, 610, IPA 198, IPA 214 and CG 001 of *B. bassiana*, as well as the isolates code 1172, 866, PL 47, IPA 204, CG 423, UOD, 860, IPA 216, E<sub>9</sub> and CG 100 of *M. anisopliae*, originated from different hosts and localities, were tested. At the concentration of 10<sup>8</sup> conidia/ml, the percentage of mortality caused by isolates of *B. bassiana* ranged from 53.3% to 83.3%, with Lethal Time (LT<sub>50</sub>) ranging from 8.5 to 14.9 days. The isolate 645 presented the highest potential to control *C. licus*. For *M. anisopliae* isolates, the percentage of larval mortality ranged from 43.3 to 80%, with LT<sub>50</sub> ranging from 7.3 to 18.0 days. The isolate 1172 was the most virulent. The lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) for the isolates 645 of *B. bassiana* and 1172 of *M. anisopliae*, were 1,17 x 10<sup>7</sup> conidia/ml and 2,34 x 10<sup>7</sup> conidia/ml, respectively, thus showing that both isolates are pathogenic to larval phase of *C. licus*.

**KEY WORDS:** Entomopathogenic fungus, microbial control, LT<sub>50</sub>.

**RESUMO** - Isolados dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. foram testados sobre lagartas de *Castnia licus* (Drury), coletadas nos canaviais da Destilaria Tabu, em Caaporã-PB. Foram utilizados os isolados de código 645, 604, 512, 447, IPA 205, IPA 202, 610, IPA 198, IPA 214 e CG 001 de *B. bassiana*, bem como os isolados de código 1172, 866, PL 47, IPA 204, CG 423, UOD, 860, IPA 216, E<sub>9</sub> e CG 100 de *M. anisopliae*, provenientes de diferentes hospedeiros e localidades. Na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/ml, a percentagem de mortalidade provocada pelos isolados de *B. bassiana* variou de 53,3 a 83,3%, com Tempo Letal (TL<sub>50</sub>) compreendido entre 8,5 e 14,8 dias, sendo que o isolado 645 apresentou maior potencial para o controle de *C. licus*. Para os isolados de *M. anisopliae*, o percentual de lagartas mortas variou de 43,3 a 80%, com os valores de TL<sub>50</sub> compreendidos entre 7,3 e 17,9 dias, sendo o isolado 1172 o mais virulento. As concentrações letais (CL<sub>50</sub>) para o isolado 645 de *B. bassiana* e 1172 de *M. anisopliae* foram de 1,17 x 10<sup>7</sup> conídios/ml e 2,34 x 10<sup>7</sup> conídios/ml, respectivamente, demonstrando que ambos isolados foram patogênicos para a fase larval de *C. licus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungo entomopatogênico, controle microbiano, TL<sub>50</sub>.

A produtividade da cana-de-açúcar é reduzida pela broca gigante *Castnia licus* (Drury), um dos principais problemas entomológicos da cultura em algumas áreas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, especialmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará e Amapá. Situação semelhante ocorre em vários outros países da América do Sul e da América Central, entre os quais estão as Guianas, Bolívia, Colômbia, Panamá e Trinidad-Tobago

(Mendonça 1996).

Nas socarias, as lagartas se alimentam do rizoma e das raízes, reduzindo bastante o poder germinativo. Em cana jovem, passam do rizoma para os rebentos, causando o secamento e posterior apodrecimento da "olhadura". Em cana adulta, a lagarta perfura os entrenós da base do colmo, justamente os locais mais ricos em sacarose (Esquivel 1980, Mendonça *et al.* 1996).

O controle de *C. licus* é dificultado pela permanência da lagarta no interior da touceira e do colmo da cana-de-açúcar, durante quase todo o seu ciclo de desenvolvimento, que é de aproximadamente 120 dias. Em consequência disto, vem sendo realizado o controle mecânico com o auxílio de enxadeco especial, através da catação de lagartas e crisálidas. As mariposas são capturadas com o uso de redes entomológicas (Mendonça 1996).

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de inúmeras pragas agrícolas. Essas espécies apresentam potencial de controle para diversas ordens de insetos (Bridge et al. 1990, Alves 1992, Pereira et al. 1993), inclusive para lepidópteros pragas, como *Plutella xylostella* (L.) (Vandenberg et al. 1998), *Alabama argillacea* (Huebner) (César Filho 2000) e *Diatraea saccharalis* Fabr. (Alves et al. 1984), como também do gênero *Castnia* que são suscetíveis a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, a exemplo da broca do talo do abacaxizeiro *Castnia icarus* (Cramer) (Silva & Veiga 1998).

Alguns trabalhos realizados com o fungo *B. bassiana* demonstram possibilidades de utilização desse microrganismo no controle biológico de *C. licus*. Vilas Boas et al. (1983) verificaram, em laboratório, a patogenicidade de *B. bassiana* para lagartas de *C. licus*, obtendo mortalidade de 60%. O comportamento do fungo sobre a praga foi testado em condições de campo por Marques et al. (1984, 1986), sendo constatadas mortalidades larvais variando de 16,7 a 33,0% após 21 dias da aplicação. Vilas Boas & Alves (1988) concluíram que isolados de *B. bassiana* e de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. apresentam potencial para o controle microbiano de *C. licus*, enquanto que Marques et al. (2001) obtiveram, em condições de laboratório, uma percentagem de mortalidade de 88% para o isolado 645 de *B. bassiana* e  $TL_{50}$  de 4,5 dias para o isolado 447.

Resultados negativos, foram obtidos quando Guagliumi (1972-73) testou *M. anisopliae* sobre lagartas de *C. licus*. No entanto, o trabalho de Marques et al. (2001) comprovou que alguns isolados de *M. anisopliae* apresentaram patogenicidade para *C. licus*, sendo de 70% a maior percentagem de mortalidade obtida, com  $TL_{50}$  de 7,5 dias.

Devido à necessidade de se buscar técnicas alternativas para o controle de *C. licus* e diante da realidade de que o controle biológico mediante fungos entomopatogênicos tem se mostrado promissor para esta praga, a presente pesquisa visou selecionar isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para o controle microbiano de *C. licus*.

## Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos da Área de Fitossanidade, pertencente ao Departamento da Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife-PE.

**Obtenção dos Insetos.** As lagartas de *C. licus* utilizadas nos experimentos foram coletadas em canaviais da Destilaria Tabu, situada no município de Caaporã-PB e transportadas

para o laboratório em seções de colmos de cana-de-açúcar, acomodados em caixas de papelão.

**Obtenção dos Isolados.** Foram utilizados nos experimentos dez isolados de *B. bassiana* e dez de *M. anisopliae*, existentes na micoteca do laboratório e obtidos a partir de diversos hospedeiros e localidades (Tabela 1). Os isolados, conservados a  $6\pm 2^\circ\text{C}$  e em tubos de vidro com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar mais o antibiótico sulfato de streptomocina (BDA+A) e óleo Nujol® esterilizado, foram repicados para placas de Petri contendo BDA + A. Após dez dias foram novamente repicados para placas contendo meio de cultura completo (MC), constituído de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,36 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,05 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,60 g; KCl, 1,0 g; glucose, 10,0 g;  $\text{NaNO}_3$ , 1,58 g; extrato de levedura, 5,0; ágar, 20,0 g e água q.s.p. 1000 ml (Alves et al. 1998). Os isolados foram uniformemente espalhados por toda a extensão das placas, com o auxílio de alça de Drigalsky. Decorridos oito dias, foram revigorados em lagartas de terceiro instar de *D. saccharalis*, oriundas da criação existente no Laboratório de Biologia de Insetos da Área de Fitossanidade da UFRPE. Transcorrido o período de dez dias, os isolados foram repicados das lagartas para BDA + A e, após oito dias procedeu-se a purificação dos isolados, mediante nova repicagem para placas com BDA + A. Passados mais oito dias, o material fúngico revigorado e purificado foi transferido para tubos de vidro, sendo conservado segundo metodologia descrita anteriormente. Para a germinação e crescimento dos isolados, durante todo esse processo, as placas foram mantidas em estufa incubadora B.O.D a  $26\pm 1^\circ\text{C}$ , com fotofase de 12h. Por ocasião dos experimentos, os isolados foram multiplicados em placas com MC, obtendo-se, portanto, o material fúngico necessário para os testes.

**Sintomatologia Apresentada Pelas Lagartas.** As avaliações dos experimentos envolveram observações dos sintomas apresentados pelas lagartas. Para este fim, os insetos mortos foram acomodados em placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada, objetivando-se acompanhar diariamente o desenvolvimento sintomatológico para confirmação do agente causal.

**Seleção dos Isolados.** Para o experimento 1 foram utilizados os isolados 645, 604, 512, 447, IPA 205, IPA 202, 610, IPA 198, IPA 214 e CG 001 de *B. bassiana*, e para o experimento 2 os isolados 1172, 866, PL 47, IPA 204, CG 423, UOD, 860, IPA 216, E<sub>9</sub> e CG 100 de *M. anisopliae*. Cada experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com onze tratamentos e três repetições, sendo cada parcela constituída por dez lagartas. As condições ambientais registradas durante o experimento 1 foram  $26\pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura,  $60\pm 5\%$  de umidade relativa do ar (UR) e fotofase de 12h. Para o experimento 2 registrou-se  $27\pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, UR de  $60\pm 5\%$  e fotofase de 12h.

Para a realização dos experimentos, as suspensões fúngicas foram preparadas adicionando-se 40 ml de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% (ADE + E) nas placas contendo os isolados multiplicados em MC, sendo removidos os conídios dos

Tabela 1. Origem e hospedeiros dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* utilizados em experimentos com *C. licus*.

Isolados	Origem	Hospedeiros
<i>B. bassiana</i>		
645	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	Amostra de solo
604	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	Amostra de solo
512	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	<i>Solenopsis invicta</i> (Buren)
447	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	<i>S. invicta</i>
IPA 205	Empresa IPA (Recife-PE)	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Germar)
IPA 202	Empresa IPA (Recife-PE)	<i>C. sordidus</i>
610	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	Amostra de solo
IPA 198	Empresa IPA (Recife-PE)	<i>C. sordidus</i>
IPA 214	Empresa IPA (Recife-PE)	<i>C. sordidus</i>
CG 001	EMBRAPA CENARGEN - DF	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)
<i>M. anisopliae</i>		
1172	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	Amostra de solo
866	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	<i>Atta</i> sp.
PL 47	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	<i>Mahanarva posticata</i> (Stal)
IPA 204	Empresa IPA (Recife-PE)	<i>M. posticata</i>
CG 423	CENARGEN - DF	<i>Schistocerca pallens</i> (Thunb)
UOD	Lab. de Patologia de Insetos (UFRPE)	<i>Castnia licus</i> (Drury)
860	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	<i>Macraspis cincta</i> (Drury)
IPA 216	Empresa IPA (Recife-PE)	<i>M. posticata</i>
E <sub>9</sub>	Lab. de Patologia de Insetos (ESALQ-USP)	<i>D. flavopicta</i>
CG 100	EMBRAPA CENARGEN - DF	<i>Scarabaeidae</i>

fungos, com o auxílio de uma pequena escova. As suspensões foram filtradas em gaze esterilizada, sendo suas concentrações ajustadas para 10<sup>8</sup> conídios/ml, mediante o uso da câmara de Neubauer. A pulverização foi efetuada com um minipulverizador manual DeVilbiss n° 15, sendo utilizados 3 ml de suspensão por repetição, ou seja, para cada placa de Petri com 14,5 cm de diâmetro, contendo 10 lagartas com tamanho variável entre 30 e 50 mm de comprimento. Para a testemunha, utilizou-se apenas ADE + E. As lagartas foram individualizadas em caixas plásticas medindo 39 x 27,3 x 9,5 cm, com divisórias de eucatex, apresentando cada compartimento uma porção de colmo de cana-de-açúcar com aproximadamente 10 cm de comprimento, perfurado em uma das extremidades, para penetração da lagarta. Em seguida, as caixas foram colocadas sobrepostas, com folha de cartolina sobre a última.

A viabilidade dos conídios foi avaliada 24h após o plaqueamento em BDA + A. Para este fim, utilizaram-se duas placas de Petri com BDA + A para cada isolado, sendo pulverizados sobre estas 10 microlitros da suspensão correspondente. As placas foram mantidas por 24h em estufa incubadora B.O.D., nas condições de temperatura e fotofase descritas anteriormente.

As avaliações foram feitas através da observação diária da mortalidade de lagartas, durante 15 dias, efetuando-se a troca de alimento, quando necessário. Os insetos mortos foram colocados em placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada, para a confirmação do agente causal.

A eficiência dos isolados foi avaliada mediante a percentagem de mortalidade de lagartas e o tempo letal

(TL<sub>50</sub>). Para o cálculo de TL<sub>50</sub>, os valores das mortalidades acumuladas foram submetidos à análise de Probit, com o auxílio do programa computacional Mobae (Haddad *et al.* 1995). Empregando-se o programa Sanest (versão 3.0), os dados referentes à mortalidade de lagartas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (P ≤ 0,05).

**Produção dos Isolados Selecionados.** Em vista da necessidade de maior produção de conídios para utilização nos testes da Concentração Letal (CL<sub>50</sub>), optou-se pela produção dos isolados 645 de *B. bassiana* e 1172 de *M. anisopliae*, selecionados como os mais eficientes, em meio de arroz cozido e esterilizado, conforme metodologia adaptada de Marques *et al.* (1981) e Vilas Boas (1988). A partir de lagartas de *C. licus* parasitadas, obtidas nos experimentos 1 e 2, os referidos isolados foram reisolados em placas de Petri contendo BDA + A. Decorridos oito dias, foram purificados em BDA + A, sendo após mais oito dias produzidos em placas cheias, contendo MC. Posteriormente, foram inoculados em garrafas de vidro com capacidade para 500 ml, contendo 140 gramas de arroz parboilizado e 90 ml de água destilada. Antes da inoculação, as garrafas foram fechadas com papel alumínio preso com cordão e autoclavadas a 120°C, durante 30 min., para esterilização e cozimento do arroz. Após o resfriamento, o arroz foi inoculado com 15 ml de suspensão de cada isolado, na concentração de 10<sup>7</sup> conídios/ml. Durante todas as etapas, os isolados foram mantidos em estufa incubadora B.O.D., nas mesmas condições de temperatura e fotofase da etapa anterior.

**Concentração Letal (CL<sub>50</sub>).** Os isolados 645 de *B. bassiana* e 1172 de *M. anisopliae* foram utilizados no experimento 3 para a determinação da concentração letal. Para tanto, prepararam-se as suspensões fúngicas nas concentrações de 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> conídios/ml. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e três repetições, inclusive a testemunha. Os tratamentos corresponderam a 30 lagartas tratadas com as diferentes concentrações dos isolados, sendo cada repetição constituída por 10 lagartas de *C. licus*. Na preparação e aplicação das suspensões, determinação da viabilidade de conídios, acomodação das lagartas e avaliações, utilizou-se a mesma metodologia empregada nos experimentos 1 e 2. Durante este experimento registrou-se a temperatura de 27±2°C, UR de 60±5% e fotofase de 12h.

A eficiência dos isolados foi avaliada através da percentagem de mortalidade de lagartas e CL<sub>50</sub>. A determinação da CL<sub>50</sub> foi efetuada mediante a utilização do programa computacional Micro Probit (versão 3.0). Os dados referentes à mortalidade de lagartas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (P≤0,05) empregando-se o programa Sanest (versão 3.0).

## Resultados e Discussão

**Sintomatologia.** Os sintomas de infecção começaram a ser observados nas lagartas quando ocorreu a supressão da alimentação e o retardamento dos seus movimentos. Sintomas característicos atribuídos ao fungo foram observados em lagartas de *C. licus* mortas por *B. bassiana*, que apresentaram inicialmente coloração rósea e consistência endurecida, enquanto que as lagartas mortas por *M. anisopliae* mostraram-se inicialmente pálidas e também endurecidas. Após a colonização do corpo dos insetos pela massa micelial, ocorreu a produção de conídios, de coloração branca para *B. bassiana* e verde para *M. anisopliae*. Algumas lagartas apresentaram

manchas escuras distribuídas pelo corpo, ocorrendo rompimento do tegumento em alguns casos, não evoluindo, portanto, para a conidiogênese, o que pode ser caracterizado como efeito do fungo, conforme referido por Alves (1998).

**Seleção de Isolados.** Embora seja usual realizar testes sobre insetos com um maior número de isolados de fungos, face às dificuldades existentes para criação de *C. licus* em laboratório ou obtenção das lagartas em tamanho uniforme no campo, utilizaram-se apenas 20 isolados, sendo 10 de cada fungo. Os isolados de *B. bassiana* apresentaram viabilidade superior a 95%, o que demonstra a alta capacidade germinativa destes. A Tabela 2 expressa os valores referentes às percentagens de mortalidade de lagartas e TL<sub>50</sub>, obtidos a partir dos isolados de *B. bassiana*, utilizados no experimento 1. A patogenicidade dos isolados foi determinada pela percentagem de mortalidade, que variou de 53,3 a 83,3%, decorridos 15 dias da inoculação. Os valores de TL<sub>50</sub> variaram de 8,5 a 14,8 dias. Os tratamentos com os isolados não causaram mortalidades significativamente diferentes entre eles, mas apenas diferiram da testemunha, indicando que todos os isolados na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/ml são patogênicos para lagartas de *C. licus*. Entretanto, os valores referentes às percentagens de mortalidade e TL<sub>50</sub> são significativos do ponto de vista biológico. Levando-se em consideração este aspecto, verifica-se que o isolado 645 provocou a maior percentagem de mortalidade de lagartas, 83,3%, enquanto que a menor TL<sub>50</sub> de 8,5 dias foi obtida para o isolado 604. Visto que os valores de TL<sub>50</sub> para os isolados 645 e 604 foram praticamente iguais, optou-se pela seleção do isolado 645, haja vista sua maior percentagem de mortalidade.

A viabilidade dos diferentes isolados de *M. anisopliae* também foi superior a 95%. Para o experimento 2, após 15 dias da inoculação, as percentagens de mortalidade obtidas para os isolados de *M. anisopliae* variaram de 43,3 a 80% e

Tabela 2. Mortalidade de lagartas de *C. licus* por isolados de *B. bassiana* na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/ml e tempo letal (TL<sub>50</sub>) (n=30).

Isolados	Mortalidade (%)	TL <sub>50</sub> e IC <sup>1</sup> (dias)	Equação da reta	X <sup>2</sup> Calculado
645	83,3 ± 0,23a	8,82 (8,61 - 9,03)	Y= 1,02875 + 4,19958	0,73
604	76,6 ± 0,62a	8,50 (7,85 - 9,20)	Y= 1,79718 + 3,44545	4,27
512	73,3 ± 0,62a	10,40 (9,75 - 11,10)	Y= 1,61417 + 3,32784	2,86
447	73,3 ± 0,47a	9,15 (8,98 - 9,33)	Y= 0,09168 + 5,10346	0,27
IPA 205	70,0 ± 0,00a	9,50 (8,69 - 10,39)	Y= 2,57066 + 2,48413	3,27
IPA 202	70,0 ± 1,08a	9,01 (8,48 - 9,56)	Y= 2,03055 + 3,11013	2,74
610	66,0 ± 1,31a	11,25 (10,66 - 11,87)	Y =2,24675 + 2,61898	1,22
IPA 198	63,3 ± 0,84a	12,17 (10,92 - 13,55)	Y= 0,34459 + 4,28939	7,85
IPA 214	63,3 ± 1,02a	12,40 (11,20 - 13,72)	Y= 3,07693 + 1,75871	1,35
CG 001	53,3 ± 1,02a	14,89 (12,13 - 18,27)	Y= 2,01644 + 2,54357	6,47
Testemunha	0,0 ± 0,00b	-	-	-
CV (%) = 25,52				
DMS (5%) = 39,04				

<sup>1</sup>TL<sub>50</sub> = Tempo letal / IC = Intervalo de confiança. Significância ao nível de 5% de probabilidade

Médias (± EP) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). Dados transformados para arc sen da raiz de x/100

os valores de  $TL_{50}$  de 7,3 a 17,9 dias (Tabela 3). Todos os isolados foram patogênicos a *C. licus*, uma vez que não apresentaram diferenças significativas entre si, mas apenas diferiram da testemunha. Considerando-se os valores da porcentagem de mortalidade e  $TL_{50}$ , o isolado 1172 foi mais eficiente, visto que provocou 80% de mortalidade para as lagartas com  $TL_{50}$  de 7,3 dias. Esses números absolutos são valores altamente representativos para o controle biológico em laboratório e indicativo de seu grande potencial para o controle em campo.

As percentagens de mortalidade de lagartas de *C. licus* por isolados de *B. bassiana*, que variaram de 53,3 a 83,3% (Tabela 2) foram comparáveis aos obtidos por Vilas Boas *et al.* (1983), que registraram 60% de mortalidade de lagartas de *C. licus* por *B. bassiana*, na concentração de  $1,64 \times 10^9$  conídios/ml, sendo porém mais significativos os resultados da atual pesquisa, uma vez que se utilizou a concentração de  $10^8$  conídios/ml. Trabalhando com os isolados 196 e 252 de *B. bassiana* na concentração de  $10^8$  conídios/ml, Vilas Boas & Alves (1988) obtiveram, respectivamente, mortalidades de 100 e 98% para *C. licus*, quando trataram os insetos por imersão. Essas mortalidades, superiores às verificadas na atual pesquisa, provavelmente ocorreram devido ao uso de diferentes isolados, como também ao modo de inoculação do fungo.

Em função de poucas referências sobre o uso de *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp. para o controle de *C. licus*, optou-se por considerar também o efeito desses entomopatógenos sobre outras espécies da ordem Lepidoptera. No presente estudo, na concentração de  $10^8$  o isolado 447 de *B. bassiana*, proporcionou 73,3% de mortalidade de larvas de *C. licus*, com  $TL_{50}$  de 9,15 dias, enquanto que Silva & Veiga (1998) constataram que o mesmo isolado provocou 54% de mortalidade para *C. icarus*, com  $TL_{50}$  de 11,6 dias, sendo portanto mais virulento para *C. licus*. Com relação a *M. anisopliae*, a mortalidade de *C. licus* obtida com os isolados

866 e PL47, respectivamente 70,0 e 66,6%, são comparáveis aos constatados pelos referidos autores, trabalhando com *C. icarus*, quando inocularam o isolado 196E de *M. anisopliae*, e constataram 68% de mortalidade para lagartas, com  $TL_{50}$  de 5,84 dias.

Os isolados 645, 604, 610 e IPA 198 de *B. bassiana* e 1172, 866, PL 47 e IPA 204 de *M. anisopliae*, na concentração de  $10^8$  conídios/ml, utilizados na presente pesquisa, proporcionaram mortalidade de 63,3 a 83,3% sobre *C. licus*. Esses isolados foram também virulentos para lagartas de terceiro instar de *A. argillacea*, com percentagens de mortalidade superiores a 53,3%, sendo de 5,7 dias o menor valor para  $TL_{50}$  (César Filho 2000).

Resultados significativos com a utilização de *B. bassiana* também foram obtidos por Lecuona *et al.* (1996), quando observaram que a mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* variou de 50 a 90%, com valores de  $TL_{50}$  compreendidos entre 2,1 e 8,4 dias.

**Concentração Letal ( $CL_{50}$ ).** Os resultados obtidos no experimento 3 (Tabela 4) referem-se às percentagens de mortalidade de lagartas ocasionadas pelos isolados 645 de *B. bassiana* e 1172 de *M. anisopliae*, bem como valores de  $CL_{50}$ .

Com base nas informações estatísticas, as percentagens de mortalidade de lagartas de *C. licus* ocasionadas pelo isolado 645 nas concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  conídios/ml não diferem entre si e da testemunha. As demais concentrações causaram mortalidades mais elevadas que a testemunha, sendo mais eficientes as ocasionadas pelas concentrações  $10^8$  e  $10^9$  conídios/ml, que não diferiram entre si, com percentagens de mortalidade acima de 86,6% e até 93,3%.

Nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  conídios/ml, as percentagens de mortalidade para o isolado 1172 não diferiram entre si e quando comparadas com a testemunha. Porém, foram diferentes das concentrações de  $10^8$  e  $10^9$  conídios/ml que, com

Tabela 3. Mortalidade de lagartas de *C. licus* por isolados de *M. anisopliae* na concentração de  $10^8$  conídios/ml e tempo letal ( $TL_{50}$ ) (n=30).

Isolados	Mortalidade (%)	$TL_{50}$ e IC <sup>1</sup> (dias)	Equação da reta	X <sup>2</sup> Calculado
1172	80,0 ± 0,40a	7,30 (6,42 - 8,30)	Y = 1,68274 + 3,84092 logx	14,86
866	70,0 ± 0,70a	8,63 (7,60 - 9,80)	Y = 2,06669 + 3,13239 logx	9,51
PL47	66,6 ± 0,23a	9,48 (8,83 - 10,18)	Y = 1,64419 + 3,43473 logx	4,55
IPA 204	63,3 ± 0,23a	11,72 (11,13 - 12,34)	Y = 1,09063 + 3,65686 logx	1,46
CG 423	56,6 ± 0,23a	11,80 (10,91 - 12,76)	Y = 1,81042 + 2,97558 logx	2,62
UOD	53,3 ± 1,43a	13,58 (12,68 - 14,55)	Y = 1,65894 + 2,94846 logx	0,84
860	50,0 ± 0,81a	14,30 (12,88 - 15,87)	Y = 0,69048 + 3,72974 logx	3,12
IPA 216	46,6 ± 0,84a	17,97 (15,18 - 21,28)	Y = 2,87817 + 1,69108 logx	1,17
E <sub>9</sub>	43,3 ± 0,62a	15,06 (14,03 - 16,16)	Y = 0,49774 + 3,82219 logx	1,54
CG 100	43,3 ± 0,62a	17,09 (15,34 - 19,05)	Y = 2,69657 + 1,86816 logx	0,87
Testemunha	0,0 ± 0,00b	-	-	-
CV (%) = 23,10				
DMS (5,0%) = 30,43				

<sup>1</sup> $TL_{50}$  = Tempo letal / IC = Intervalo de confiança. Significância ao nível de 5% de probabilidade

Médias (± EP) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05). Dados transformados para arc sen da raiz de x/100

Tabela 4. Mortalidade de lagartas de *C. licus* pelos isolados 645 de *B. bassiana* e 1172 de *M. anisopliae*, nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios/ml e  $CL_{50}$  (n=30)

Isolado	Concentração (conídios/ml)	Mortalidade (%)	$CL_{50}$ (Conídios/ml) (IC) <sup>1</sup>	b <sup>2</sup>	X <sup>2 3</sup>
645	$10^5$	10,0 ± 0,40cd	1,17 x 10 <sup>7</sup> (5,77 x 10 <sup>6</sup> - 2,27 x 10 <sup>7</sup> )	0,89	4,59
	$10^6$	16,6 ± 0,23cd			
	$10^7$	36,6 ± 0,47bc			
	$10^8$	86,6 ± 0,47a			
	$10^9$	93,3 ± 0,23a			
1172	$10^5$	3,3 ± 0,23cd	2,34 x 10 <sup>7</sup> (1,19 x 10 <sup>7</sup> - 4,61 x 10 <sup>7</sup> )	0,90	3,68
	$10^6$	13,3 ± 0,62cd			
	$10^7$	26,6 ± 0,23cd			
	$10^8$	80,0 ± 0,40ab			
	$10^9$	90,0 ± 0,40a			
Testemunha	0	0,0 ± 0,00d			
CV (%) = 27,93					
DMS (5%) = 31,10					

<sup>1</sup> $CL_{50}$  = Concentração letal / IC (95%) = Intervalo de confiança. Significância ao nível de 5% de probabilidade

<sup>2</sup>b = Coeficiente angular da reta

<sup>3</sup>X<sup>2</sup> = Teste X<sup>2</sup>

Médias (± EP) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). Dados transformados para arc sen da raiz de x/100

comportamento análogo ao das concentrações de igual valor utilizadas para o isolado 645, apresentaram percentagens de mortalidade de 80 e 90% respectivamente.

A determinação da  $CL_{50}$  é importante quando se deseja determinar qual o produto que apresenta a dose mais econômica, objetivando-se utilizá-lo no campo. A  $CL_{50}$  para o isolado 645 de *B. bassiana* foi de  $1,17 \times 10^7$  conídios/ml, variando de  $5,77 \times 10^6$  a  $2,27 \times 10^7$  conídios/ml, e para o isolado 1172 de *M. anisopliae*, a  $CL_{50}$  foi de  $2,34 \times 10^7$  conídios/ml, variando de  $1,19 \times 10^7$  a  $4,61 \times 10^7$  conídios/ml. Observa-se, pois, que o isolado 645 apresentou  $CL_{50}$  duas vezes menor em relação àquela obtida para o isolado 1172, o que sugere a utilização do isolado 645, para controle de *C. licus*, pois além de ter se mostrado o mais eficiente, considerando-se o valor da  $CL_{50}$ , foi também o mais virulento dos isolados testados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Esta pesquisa confirmou a importância de isolados de *B. bassiana* para utilização no controle microbiano de *C. licus*, em função dos elevados valores de mortalidade obtidos, os quais se enquadram nos níveis esperados para resultados de experimentos em laboratório. Paralelamente, os resultados obtidos com *M. anisopliae* indicaram que esse fungo, embora em níveis menos elevados, também apresentou potencial para o controle da praga.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo de mestrado concedida ao primeiro autor, bem como ao Engenheiro Agrônomo Sílvio Lemos Antunes da Destilaria Tabu, em Caapora, Paraíba, pela coleta e concessão de material biológico, e aos dois revisores anônimos pelas valiosas críticas e sugestões.

### Literatura Citada

- Alves, S.B. 1992.** Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 77-86.
- Alves, S.B. 1998.** Microrganismos associados a insetos, p. 75-96. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998.** Técnicas de laboratório, p.637-771. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Alves, S.B., S.H. Risco, S. Silveira Neto & R. Machado Neto. 1984.** Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* to *Diatraea saccharalis*. *Zeitsch. Angew. Entomol.* 97: 403-406.
- Bridge, P.D., Y.J. Abraham, M.C. Cornish, C. Prior & D. Moore. 1990.** The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Mycology* 111: 85-90.
- César Filho, E. 2000.** Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para lagartas de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e o efeito de inseticidas sobre esses entomopatogênicos. Dissertação de mestrado, UFRPE, Recife, 53p.
- Esquivel, E.A. 1980.** Basic studies on sugarcane resistant

- varieties to the giant borer *Castnia licus* Drury in Panamá. Entomol. Newsl. 8: 8-9.
- Guagliumi, P. 1972-73.** Pragas da cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil, Rio de Janeiro, IAA, 622p.
- Haddad, M.L., R.C.B. Moraes & J.R.P. Parra. 1995.** MOBAE, Modelos bioestatísticos aplicados à entomologia. Manual. ESALQ/USP. 44p.
- Lecuona, R.E., M.S. Tigano & B.M. Diaz. 1996.** Characterization and Patogenicity of *Beauveria bassiana* Against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. An. Soc. Entomol. Brasil 25: 299-307.
- Marques, E.J., A.M. Vilas Boas, C.E.F. Pereira. 1981.** Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) em laboratórios setoriais. Planalsucar, Piracicaba, 23p. (Boletim Técnico nº 2).
- Marques, E.J., A.M. Vilas Boas, R.O.R. Lima & S.M.A. Ribeiro. 1984.** Efeito do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e alguns inseticidas no controle de *Castnia licus* D., broca gigante da cana-de-açúcar. Bras. Açucareiro 102: 36-39.
- Marques, E.J., A.M. Vilas Boas, R.O.R. Lima & S.M.A. Ribeiro. 1986.** The potentiality of the *Beauveria bassiana* at the control of *Castnia licus*, the Giant Borer of Sugarcane. STAB – Sugar, Alcohol By-prod. 4: 79-80.
- Marques, E.J., I.M.R. Marques, R.O.R. Lima, M.F.S. Figueirêdo, E.S. Araújo & E.A. Autran. 2001.** Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre larvas de *C. licus*, broca gigante da cana-de-açúcar. Cad. Ômega Univ. Fed. Rural PE 12: 17-19.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar na América Latina e Caribe, p. 1-48. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Mendonça, A.F., J.A. Viveiros, & F. Sampaio Filho. 1996.** A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep., Castniidae), p. 133-167. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Pereira, R.M., J.L. Stímac & S.B. Alves. 1993.** Soil antagonism affecting the dose-response of workers of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. J. Invertebr. Pathol. 61: 156-161.
- Silva, R.B.Q. & A.F.S.L. Veiga. 1998.** Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre *Castnia icarus* (Cramer, 1775). Rev. Agric. 73: 119-127.
- Vandenberg, J.D., A.M. Shelton, W.T. Wilsey & M. Ramos. 1998.** Assesment of *Beauveria bassiana* sprays for control the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on crucifers. J. Econ. Entomol. 91: 624-630.
- Vilas Boas, A.M. 1988.** Produção e atuação do bioinseticida *Metarhizium anisopliae* sobre a cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata* em Pernambuco. Goiânia, Embrapa-CNPAF, 17p.
- Vilas Boas, A.M., E.J. Marques, S.M.A. Ribeiro, 1983.** Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., sobre larvas de *Castnia licus* Drury (Lepidoptera, Castniidae), broca gigante da cana-de-açúcar. An. Soc. Entomol. Brasil 12: 295-298.
- Vilas Boas, A.M. & S.B. Alves, 1988.** Patogenicidade de *Beauveria* spp. e seu efeito associado ao inseticida monocrotofós sobre *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castniidae). An. Soc. Entomol. Brasil 17: 305-332.

Received 29/08/01. Accepted 10/07/02.