

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROK.
(DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) PARA O CONTROLE DE
MAHANARVA FIMBRIOLATA (STAL, 1854) (HEMIPTERA:
CERCOPIDAE) EM CANA-DE-AÇÚCAR

A.F. Freitas¹, E.S. Loureiro^{1,2}, M.E.B. de Almeida¹, L.G.A. Pessoa²

¹Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, CP 533, CEP 79804-970, Dourados, MS, Brasil. E-mail: a_ffreitas@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi selecionar isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) patogênicos para a cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata*. O estudo foi feito em condições de laboratório, utilizando-se exemplares de ninfas de cigarrinha da raiz que, após serem cuidadosamente separadas por tamanho em grupos de 10 indivíduos, foram inoculadas com suspensões de conídios da ordem de $1,0 \times 10^7$; $0,5 \times 10^8$; $1,0 \times 10^8$; $0,5 \times 10^9$ e $1,0 \times 10^9$ conídios/mL para o isolado IBCB 425 (padrão) do fungo e a seguir mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10 \text{ UR}$ e fotofase de 12h. Foram observadas a mortalidade total, a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott e a mortalidade confirmada. 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 TL_{50} (2,75 dias). Dentre os isolados de *M. anisopliae* avaliados, sete (UFGD 425, UFGD 22, PL 43, IBCB 348, UFGD 28, UFGD 05 e UFGD 03) causaram mortalidade confirmada de pelo menos 70% da população de ninfas após o sétimo dia da inoculação, mostrando potencialidade como agentes de controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, controle microbiano, cigarrinha da raiz, patogenicidade, *Saccharum* spp.

ABSTRACT

SELECTION OF *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROK. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) ISOLATES FOR THE CONTROL OF *MAHANARVA FIMBRIOLATA* (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) IN SUGARCANE. The objective of this research was to select isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Deuteromycotina: Hyphomycetes) pathogenic to the frog hopper *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). The study was carried out in laboratory conditions, using specimens of the frog hopper nymphs that, after being carefully separated for size in groups of 10 individuals, were inoculated with a suspension of conidia containing 1.0×10^7 ; 0.5×10^8 ; 1.0×10^8 ; 0.5×10^9 and 1.0×10^9 conidia/mL for isolate IBCB 425 (standard) of the fungus, and then kept in an incubator at $25 \pm 1^\circ \text{C}$, RH 70 ± 10 and 12h photophase. The total mortality, mortality corrected by Abbott's formula and confirmed mortality were determined. It was observed that the concentration of 1.0×10^9 conidia/mL showed the greatest effect on *M. fimbriolata*, presenting the shortest TL_{50} (2.75 days). Among the isolates of *M. anisopliae* evaluated, 7 (UFGD 425, UFGD 22, PL 43, IBCB 348, UFGD 28, UFGD 05 and UFGD 03) caused confirmed mortality of at least 70.0% of the population of nymphs after the 7th day after inoculation, showing potential as control agents of the sugarcane root frog hopper.

KEY WORDS: Biological control, microbial control, frog hopper, pathogenicity, *Saccharum* spp.

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, devido à boa rentabilidade que o comércio do açúcar e álcool combustível tem proporcionado ao setor. A diversificação da produção, como o

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, MS, Brasil.

açúcar orgânico, tem permitido ao setor explorar novos nichos do mercado nacional e internacional, atendendo a uma demanda crescente por este tipo de alimento (EMBRAPA, 2008).

Na colheita da cana-de-açúcar sem queima prévia, a palha e o palhicho 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 do conteúdo de 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* 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), sendo que, até este advento, a praga era tratada como de pouca expressão econômica.

O controle microbiano de *M. fimbriolata* e de outras cigarrinhas da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae* é possível e tem sido utilizado com sucesso nos estados produtores da cultura na região Nordeste e Sudeste do Brasil (ALVES, 1998), bem como em outros países da América Latina e Caribe. Nos estados do Nordeste, *M. anisopliae* vem sendo utilizado no controle da cigarrinha *Mahanarva 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).

Sabe-se que a intensidade de isolados de *M. anisopliae* em causar mortalidade em ninfas de *M. fimbriolata* pode variar com as condições edafoclimáticas de cada região e com a susceptibilidade das populações dessa praga aos isolados. O Estado do Mato Grosso do Sul apresenta condições climáticas diferentes das encontradas nos estados de origem da maioria dos isolados mantidos em coleções de culturas de fungos entomopatogênicos. Assim, tornam-se necessários estudos visando selecionar isolados de *M. anisopliae* adaptados às condições microclimáticas das diversas regiões do estado, tendo em vista que, de acordo com ALMEIDA et al. (1997) apud BATISTA FILHO (2003), 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, em condições de laboratório, isolados de *M.*

anisopliae patogênicos para ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

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 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 da 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 (medindo de 6 a 8 mm de comprimento) foram colocadas, separadamente, no interior de caixas de isopor contendo folhas de cana e transportadas para o laboratório.

O bioensaio foi composto por 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 das suspensões relativas a cada uma das concentrações de conídios foi feita sobre a folha de cana contendo as cigarrinhas de mesmo tamanho, com o auxílio de uma micropipeta. As placas de Petri contendo os insetos foram fechadas e mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 1^{\circ}$

C, com fotofase de 12 horas e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ (LOUREIRO *et al.*, 2005).

A mortalidade foi avaliada diariamente. Cada inseto morto foi lavado em álcool 70% e água destilada esterilizada, para desinfestação superficial. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri contendo um chumaço de algodão umedecido, mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, com fotofase de 12 horas e umidade relativa de $70 \pm 10\%$. Por meio deste procedimento obteve-se 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.

A concentração que causou maior porcentagem de mortalidade confirmada pela análise de Probit (ALVES, 1998) para obtenção dos valores de TL_{50} , 5 dias após a inoculação, foi utilizada nos experimentos subsequentes.

Seleção dos isolados de *Metarhizium anisopliae*

Baseado na concentração determinada no ensaio anterior foram realizados bioensaios utilizando a metodologia já descrita para testar a eficiência de 24 isolados de *M. anisopliae*. A seleção de isolados foi baseada na porcentagem de mortalidade confirmada de *M. fimbriolata*.

Foram realizados cinco bioensaios compostos por grupos de diferentes isolados usados na concentração de 1×10^9 conídios/mL, um tratamento testemunha e um tratamento composto pelo isolado IBCB 425 usado como padrão.

A mortalidade foi verificada diariamente durante o período de avaliação determinando-se a patogenicidade de cada isolado para o inseto. Os cadáveres

foram mantidos em câmara úmida, 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% até o sexto dia após a inoculação foram selecionados para a etapa de produção em arroz pré-cozido.

Foram coletados os dados de mortalidade confirmada, mortalidade total, mortalidade corrigida [calculada pela fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925)], para o 4º, 6º e 7º 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 1). Na concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL, a ação patogênica do fungo para as ninfas foi maior, resultando em um menor tempo letal (TL_{50}) de 2,75 dias, valor este bastante expressivo quando comparado ao tempo letal obtido na menor concentração (7,10 dias). Essa concentração que promoveu a maior mortalidade de ninfas de *M. fimbriolata*, dentre as demais concentrações testadas, difere 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. Verificou-se ainda que não ocorreu diferença significativa entre as demais concentrações testadas, com base na sobreposição dos intervalos de confiança obtidos (Tabela 1).

Tabela 1 - Tempos letais medianos (TL_{50}) em dias, intervalos de confiança (IC) ($p \leq 0,05$), equações de regressão linear e valores de χ^2 obtidos pela análise de Probit, para a ação patogênica do isolado IBCB 425 de *Metarhizium anisopliae* sobre *Mahanarva fimbriolata*.

Concentrações	TL_{50}	IC	Equação	χ^2
$1,0 \times 10^9$ conídios/mL	2,75	(2,52; 3,00)	$Y = 3,81 + 2,68.\log x$	0,12
$0,5 \times 10^9$ conídios/mL	4,09	(2,42; 6,90)	$Y = 3,58 + 2,31.\log x$	1,46
$1,0 \times 10^8$ conídios/mL	4,26	(2,59; 7,00)	$Y = 3,66 + 2,12.\log x$	1,03
$0,5 \times 10^8$ conídios/mL	5,30	(2,85; 9,85)	$Y = 2,61 + 3,29.\log x$	1,62
$1,0 \times 10^7$ conídios/mL	7,10	(3,52; 14,32)	$Y = 2,74 + 2,64.\log x$	0,71

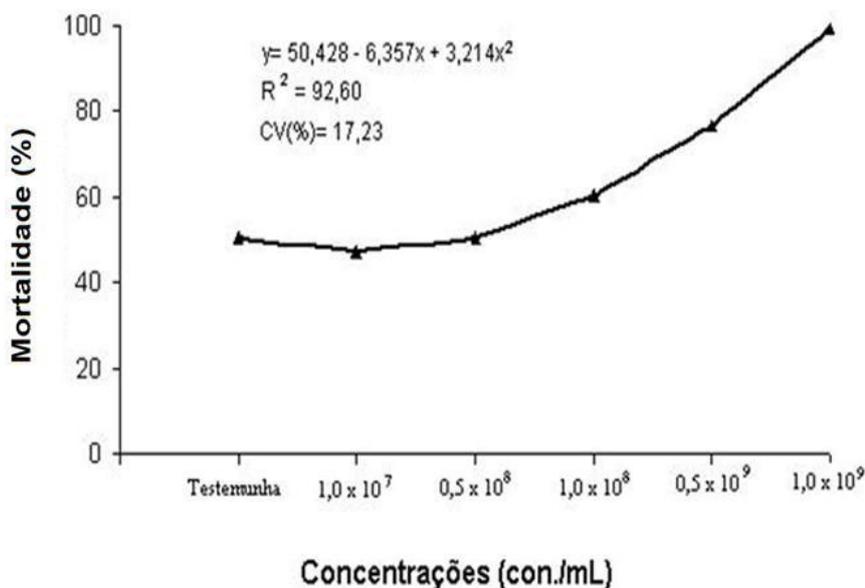


Fig. 1 - Mortalidade de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* cinco dias após a aplicação do isolado IBCB 425 de *Metarhizium anisopliae*, nas concentrações de 1×10^7 , $0,5 \times 10^8$ e 1×10^8 , $0,5 \times 10^9$, $1,0 \times 10^9$ conídios/mL ($25 \pm 1^\circ$ C, fotofase de 12 horas e $70 \pm 10\%$ UR).

Por meio da análise de regressão, verificou-se que o número de insetos mortos até o 5º dia foi maior para a concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL (Fig. 1). Esta concentração é maior que aquela 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 maior número de insetos mortos até o 5º dia ocorreu na concentração 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 dos insetos em função de características fisiológicas relacionadas ao habitat em que vive a praga (GUAGLIUMI, 1972).

Segundo FUTUYMA (1992), muitas das características dos organismos são adaptações ao seu ambiente. Grande parte da biologia, sejam aspectos bioquímicos, fisiológicos ou ecológicos, consiste, na realidade, do estudo das adaptações. Algumas cigarrinhas-das-raízes que se apresentam tolerantes em uma região canavieira comportam-se como mais tolerantes ou menos tolerantes em outra região, dependendo das diferentes condições de clima, solo, umidade, temperatura, variedades de cana-de-açúcar.

Bioensaios de seleção de isolados

Ocorreu variação na mortalidade promovida pelos isolados testados, que variou de 24 a 72% para

a mortalidade total e de 2,6 a 53,3% para a mortalidade corrigida, no quarto dia após a aplicação dos isolados UFGD 05 e UFGD 23 sobre as ninfas de *M. fimbriolata* (Tabela 2). 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 existentes na população, alterações no tempo de manipulação do inseto entre outros fatores (ALVES, 1998).

MACEDO *et al.* (2006) relataram mortalidades corrigidas de ninfas de *M. fimbriolata* variando entre 10,5 a 60%, cinco dias após a inoculação. Os isolados mais patogênicos foram 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, na concentração de $5,0 \times 10^7$ conídios/mL valores estes próximos aos encontrados para a mortalidade causada pelos isolados avaliados no presente estudo. Os isolados 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 mortalidade de 42 e 52%, respectivamente (Tabela 2). 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 provocada por *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 2).

Tabela 2 - Mortalidade média acumulada (%), total e corrigida, de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* no 4^o, 6^o e 7^o dias após a inoculação com os isolados de *Metarhizium anisopliae* (25 ± 1° C, fotofase de 12 horas e 70 ± 10% UR).

Isolados	Mortalidade no quarto dia após a inoculação		Mortalidade no sexto dia após a inoculação		Mortalidade no sétimo dia após a inoculação	
	Total	Corrigida	Total	Corrigida	Total	Corrigida
1^o Bioensaio						
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
2^o Bioensaio						
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
3^o Bioensaio						
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^o Bioensaio						
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^o Bioensaio						
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

LOUREIRO *et al.* (2005) obtiveram grande variação na patogenicidade para ninfas de *M. fimbriolata* coletadas no Estado de São Paulo, com mortalidade total variando de 66 a 100% e mortalidade corrigida variando de 0 a 100% aos seis dias após a inoculação. Aos sete dias após a inoculação das ninfas, ocorreu variação de 92 a 100% para a mortalidade total e 63,6% a 100% 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 a 100% e 12,8 a 75%, 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 por grande parte das biofábricas e usinas canavieiras 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 virulência que incluem a dimensão dos conídios, taxa de crescimento e atividades enzimáticas (ST. LEGER *et al.*, 1992).

A mortalidade total na testemunha, no 4º dia após a pulverização, variou de 22 a 40%, 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 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.

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 do inseto, pois, sendo ele um componente do agroecossistema, sua presença, em nível abaixo do dano econômico, pode ser benéfica para a manutenção dos predadores, parasitoides 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 testemunha, não ocorreu esporulação do fungo 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 IBCB 425, UFGD 22, PL 43, IBCB 348, UFGD 28, UFGD 05 e UFGD 03 estão entre os mais patogênicos, causando porcentagem de mortalidade confirmada das ninfas após o sétimo dia da inoculação de 84; 82; 78; 76; 76; 74; 70%, respectivamente, mostrando potencialidade como agentes de controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar (Tabela 3).

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 micro-organismo 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 micro-organismo

a ser usado no controle microbiano (DEVI *et al.*, 2001). Quatro isolados causaram mortalidade confirmada entre 71 a 80% e dois isolados causaram mortalidade entre 81 a 90% decorridos sete dias da pulverização sobre as ninfas de *M. fimbriolata* (Tabela 3). LOUREIRO *et al.* (2005) relataram que até o 4º dia a mortalidade confirmada máxima obtida pelos isolados variou de 61 a 70%, enquanto que, para o 6º dia, a mortalidade confirmada máxima foi ao redor de 81 a 90%. Observou-se também que algumas ninfas não sofreram ecdise, uma vez que foram colonizadas pelo fungo.

Os resultados obtidos mostraram que isolados de *M. anisopliae*, provenientes de diferentes hospedeiros e região, são patogênicos para ninfas de *M. fimbriolata*, mas diferem quanto à capacidade de agressão do hospedeiro, evidenciando a importância de efetuar bioensaios para a seleção de isolados antes do desenvolvimento de um produto microbiano. Esses bioensaios devem avaliar a virulência das raças e dos patógenos visando selecionar os mais agressivos e que possam ser produzidos em meios artificiais (ALVES, 1998).

Tabela 3 - Mortalidade média acumulada confirmada de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* sete dias após a pulverização pelos isolados de *Metarhizium anisopliae* (25 ± 1° C, fotofase de 12 horas e 70 ± 10% UR).

Isolados	Mortalidade (%)
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
Teste F	5,39
CV (%)	44,31

Letras seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v.18, n.15, p.265-267, 1925.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). *Journal of Applied Entomology*, Berlin, v.121, n.9/10, p.539-543, 1997. apud BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES, S.B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.3, p.309-314, 2003. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v70_3/batista.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2009.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. *Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.20, n.2, p. 30-33, 2001. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio20/20_6.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2009.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A. Controle da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*, com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *Revista STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v.22, n.4, p.42-45, 2004.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____ (Ed.). *Controle microbiano dos insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-381.
- ALVES, S.B.; LOPES, J.R.S.; ALVES, L.F.A.; MOINO JÚNIOR, A. Controle microbiano de artrópodos associados a doenças de plantas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. de (Ed.). *Controle biológico*. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. Cap.5, p.143-170.
- BARBOSA, V. Cultivo de soqueira, adubação e reforma de canaviais sob sistema de cana crua. In: SEMANA DA CANA-DE-AÇÚCAR DE PIRACICABA, 4., 1998, Piracicaba. *Anais*. Piracicaba: 1998. p.31-32.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES, S.B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.3, p.309-314, 2003. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v70_3/batista.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2009.
- DEVI, K.U.; PADMAVATHI, J.; SHARMA, H.C.; SEETHARAMA, N. 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 and Biotechnology*, v.17, n.2, p.131-137, 2001. Disponível em: <http://dSPACE.icrisat.ac.in/bitstream/10731/1302/1/WorldJMicroBio-tech17_2_131-137_2001.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2009.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; PACHECO, M.R.M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. *Ciência e Cultura*, v.40, n.11, p.1103-1105, 1988.
- DINARDO-MIRANDA, L.L.; FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M.G.A.; FERREIRA, J.M.G.; CARVALHO, P.A.M. Danos causados pelas cigarrinhas das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. *Revista STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v.17, n.5, p.48-52, 1999.
- EMBRAPA. (Brasil). *Manual de Editoração*. 2008. Disponível em: <<http://manual.sct.embrapa.br/editorial/default.jsp>>. Acesso em: 20 jul. 2009.
- FURLANI NETO, V.L. *Colhedora de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) avaliação em canaviais com e sem queima prévia*. 1995. 105f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.
- FUTUYMA, D.J.O contexto ecológico da mudança evolutiva. In: _____. (Ed.). *Biologia evolutiva*. Ribeirão Preto: FUNPEC, 1992. p.20-44.
- GUAGLIUMI, P. *Pragas da Cana-de-açúcar – Nordeste do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Álcool, 1972. 622p.
- LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. 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*, v.34, n.5, p.791-798, 2005.
- LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*, v.29, n.4, p.553-561, 2005.
- MACEDO, D.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. a *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). *Semina: Ciências Agrárias*, v.27, n.1, p.47-52, 2006.

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

SOSA-GÓMEZ, D.R.; PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B. Impacto ambiental de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.1075-1096. Cap.37.

ST. LEGER, L.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic differences

in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.60, n.1, p.89-101, 1992.

Recebido em 22/4/11

Aceito em 25/11/11