

BIOLOGICAL CONTROL

Seleção de Isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Contra a Cigarrinha da Raiz da Cana-de-Açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em Laboratório

ELISÂNGELA DE S. LOUREIRO¹, ANTONIO BATISTA FILHO², JOSÉ E.M. ALMEIDA² E LUIS G.A. PESSOA¹

¹Depto. Ciências Biológicas, Univ. Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Dourados. Rod. Dourados-Itahum km 12, Cidade Universitária. C. postal 533, 79804-970, Dourados, MS, lis_loureiro@yahoo.com.br

²Lab. Controle Biológico, Instituto Biológico, C. postal 70, 13001-970, Campinas, SP

Neotropical Entomology 34(5):791-798 (2005)

Screening of *Metarhizium Anisopliae* (Metsch.) Sorok. Strains against the Sugarcane Root Spittlebug *Mahanarva Fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in Laboratory

ABSTRACT - The accumulated mulch on the soil resultant from the mechanized cutting of sugarcane promotes favorable temperature and moist to *Mahanarva fimbriolata* (Stål), a pest that causes serious problems due to its widespread occurrence and high populations. Seventy nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. from different hosts and regions were tested for their pathogenicity. Ten spittlebugs were put in petri dishes (9 cm of diameter) containing sugarcane leaves sprayed with 1 ml of a suspension containing 5×10^7 conidia/ml. Five replicates were used per treatment. The petri dishes were kept at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH and 12h photophase. Insects were monitored daily to calculate total cumulative mortality, as well as corrected and confirmed mortality for each treatment. The best tested isolates were: IBCB 348, IBCB 351, IBCB 363, IBCB 408, IBCB 410, IBCB 418, IBCB 425 and IBCB 482, which showed confirmed mortality equal or higher than 70%, six days after spraying.

KEY WORDS: Insecta, entomopathogenic fungi, biological control, microbial control

RESUMO - O corte mecanizado da cana-de-açúcar resulta num acúmulo da palhada depositada no solo, proporcionando temperatura e umidade favoráveis à cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stål), que provoca sérios problemas devido a sua ocorrência generalizada e altas populações. A patogenicidade de 79 isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, provenientes de diferentes hospedeiros e regiões do País, foi testada em laboratório. Dez ninfas da cigarrinha foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo folhas de cana lavadas e pulverizadas com 1 ml de uma suspensão contendo 5×10^7 conídios/ml. Cada tratamento foi composto por cinco repetições. Após a pulverização, as placas foram colocadas em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12h. A mortalidade foi avaliada diariamente, calculando-se os índices de mortalidade acumulada total, confirmada e corrigida de cada tratamento. Os melhores isolados testados foram: IBCB 348, IBCB 351, IBCB 363, IBCB 408, IBCB 410, IBCB 418, IBCB 425 e IBCB 482, os quais apresentaram mortalidade confirmada igual ou superior a 70% seis dias após a pulverização.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, fungo entomopatogênico, controle biológico, controle microbiano

Com a adoção do corte mecanizado da cana-de-açúcar, sem queima, ocorre um acúmulo da palhada depositada no solo, proporcionando temperatura e umidade favoráveis à cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stål), inseto-praga que provoca sérios problemas devido a sua ocorrência generalizada e altas populações (Dinardo-Miranda *et al.* 2001, Almeida *et al.* 2002b).

O Decreto-Lei estadual nº 42.056/96, que dispõe sobre

a proibição da despalha da cana-de-açúcar para a indústria por queima, atende os anseios tecnológicos para o aumento da produtividade sustentável da cana-de-açúcar no estado de São Paulo. Considerando que a legislação ambiental de São Paulo proibirá a queimada em toda a área do estado, espera-se um aumento significativo na população de *M. fimbriolata*. Entre as ferramentas para minimizar o problema, que se enquadre num programa de manejo

sustentável da cultura, está o controle biológico, principalmente utilizando-se o fungo *Metarhizium anisopliae*.

No Nordeste, *M. anisopliae* vem sendo utilizado com grande sucesso no controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* (Stål) na cultura da cana-de-açúcar (Alves 1998). O programa teve início em 1969 e, a partir de 1975, o fungo passou a ser produzido em laboratórios das usinas de açúcar em Pernambuco. Uma das etapas mais importantes desse programa foi a utilização de um isolado de *M. anisopliae* altamente virulento à praga, selecionado em bioensaios a partir de um grande número de isolados coletados na região (Alves 1998). No estado de São Paulo, em experimentos realizados por Almeida *et al.* (2002a) no sistema de cultivo orgânico da cana-de-açúcar, após 60 dias da pulverização do fungo houve uma redução de ninfas em todos os tratamentos e, após 90 dias da aplicação do fungo, a infestação foi de 1,4 ninfas/m². O isolado IBCB 10 de *M. anisopliae* foi mais eficiente quando comparado com os isolados ESALQ 1037 e PL 43, aplicados mensalmente em novembro e dezembro (Batista Filho *et al.* 2002).

O presente trabalho teve por objetivo selecionar isolados virulentos do fungo de *M. anisopliae*, em condições de laboratório, com potencial para uso no controle de ninfas de *M. fimbriolata*.

Material e Métodos

Obtenção dos Isolados. Os isolados de *M. anisopliae* são provenientes da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, Campinas, SP. Para a realização dos bioensaios, cada isolado foi multiplicado colocando-se uma pequena quantidade de conídios puros, espalhados com alça de Drigalsky, em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio completo (MC) esterilizado. As placas foram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h por um período de oito dias e posteriormente armazenadas em geladeira (4°C) até a utilização nos experimentos.

Estabelecimento da Concentração. Inicialmente foi realizado um bioensaio para estabelecimento da concentração a ser utilizada nos experimentos de seleção de isolados utilizando-se, como padrão, o isolado IBCB 348. Foram testadas quatro concentrações de *M. anisopliae* (1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 e 5×10^6 conídios/ml) e um tratamento testemunha que recebeu apenas água destilada estéril. A concentração utilizada foi aquela que, quatro dias após a pulverização, causou porcentagem de mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu esporulação do fungo) superior a 70%, determinada pela análise de Probit para obtenção dos valores de CL_{50} (conídios/ml). Cada tratamento foi composto por cinco placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo uma folha de cana-de-açúcar de 8 cm de comprimento. Sobre as folhas de cana-de-açúcar foram colocadas 10 ninfas, perfazendo o total de 50 insetos por tratamento. A aplicação de 1 ml das suspensões de *M. anisopliae* foi feita sobre a folha de cana-de-açúcar contendo as cigarrinhas. As placas de Petri foram fechadas e mantidas

a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa. As ninfas foram coletadas em canalial isento de pulverizações com produtos fitossanitários. A mortalidade foi avaliada diariamente e cada inseto morto foi lavado em álcool 70% e água destilada esterilizada, para desinfecção superficial. Em seguida, os insetos foram transferidos para placas ELISA, esterilizadas e colocadas dentro de um recipiente plástico hermético. O recipiente plástico foi mantido nas mesmas condições climáticas citadas anteriormente. Por meio desse procedimento obteve-se a confirmação da mortalidade causada pelo patógeno, observando-se o crescimento micelial e conidiogênese na parte externa do cadáver.

Seleção dos Isolados. Baseado na concentração encontrada no experimento anterior foram realizados cinco bioensaios utilizando a mesma metodologia para o estabelecimento da concentração contendo, cada um, quantidades diferentes de isolados, um tratamento testemunha e o isolado padrão IBCB 348, para os 79 isolados testados. A mortalidade foi verificada diariamente. Os cadáveres foram observados e aqueles que apresentaram extrusão e reprodução do patógeno foram anotados e representaram a mortalidade confirmada. Foram selecionados os isolados que apresentaram porcentagem de mortalidade $\geq 70\%$ até o sexto dia após a pulverização, mantidos em câmara úmida. Foram calculados os dados de mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu esporulação do fungo), mortalidade total (mortalidade independente da causa) e mortalidade corrigida calculada pela fórmula de Abbott (1925), para o 4º e 6º dias após a inoculação.

Resultados e Discussão

Estabelecimento da Concentração. A análise de Probit indicou que o número de insetos infectados mortos até o 5º dia foi maior para a CL_{50} de $1,2 \times 10^7$ conídios/ml (Fig. 1). A mortalidade confirmada e as concentrações foram consideradas parâmetros no estudo do comportamento dos melhores isolados uma vez que indicam a capacidade de colonização do patógeno, superando todos os agentes competidores presentes no inseto (Neves 1998). Os cadáveres que apresentaram extrusão e reprodução do patógeno foram anotados e representaram a mortalidade confirmada. Levando-se em consideração que nos insetos mortos onde o fungo não se desenvolveu pode ter ocorrido septicemia, caracterizada pelo aspecto e odor. Duas hipóteses podem explicar essa situação. A primeira hipótese é que fungo tenha possibilitado a entrada de outros microorganismos (bactérias) através dos orifícios presentes na cutícula, no momento da penetração. A segunda é que o fungo provoca o rompimento do tecido epitelial pela germinação/penetração ou pela liberação de toxinas que desestruturam a parede intestinal, possibilitando contaminação da hemolinfa. Além disso, a contaminação externa dos insetos pode ser maior quando são manipulados durante a instalação dos bioensaios (Neves 1998).

Seleção de Isolados. Ocorreu variação na virulência entre

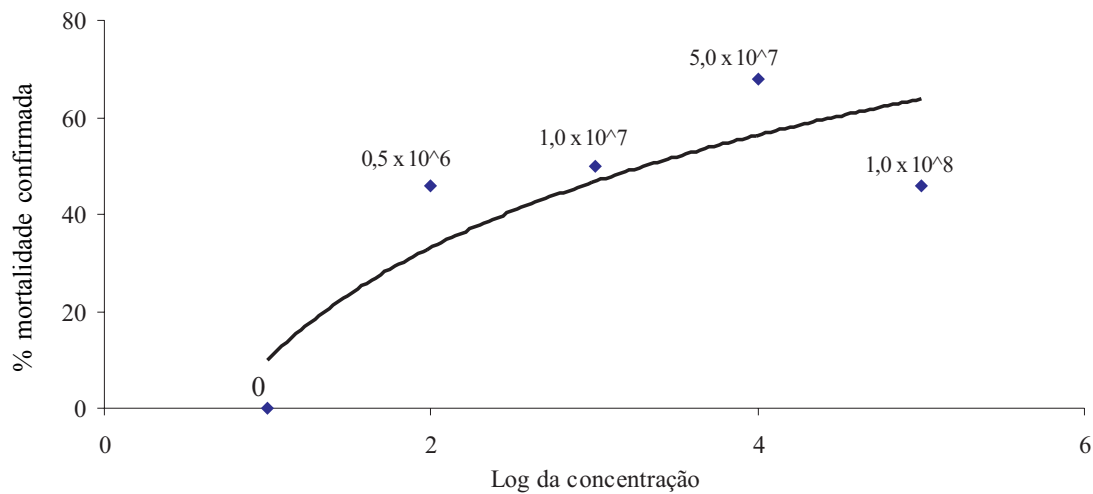


Figura 1. Mortalidade (%) das ninfas de *M. fimbriolata* quatro dias após aplicação com *M. anisopliae* (isolado IBCB 348), nas concentrações de 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 e 1×10^8 conídios/ml. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ UR)

os isolados de *M. anisopliae* testados de 66% a 100% (mortalidade total) e de zero a 100% (mortalidade corrigida), seis dias após a inoculação (Tabelas 1 a 5). A 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). O período que os fungos

entomopatogênicos levam para provocar a morte de uma determinada espécie (tempo médio de incubação) varia em função de diversos fatores, dentre eles a espécie do hospedeiro e estágio de desenvolvimento. Resultados semelhantes aos relatados aqui foram encontrados por Moino Jr. *et al.* (1998) ao avaliar a patogenicidade de 72 isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para três espécies

Tabela 1. Mortalidade acumulada (confirmada, total e corrigida) (\pm EP) (%) quatro e seis dias após a pulverização de isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* sobre ninfas de *M. fimbriolata*. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ UR) (n = 50 insetos)

Isolados	4 dias			6 dias		
	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida
Testemunha	0,0 \pm 0,00	36,0 \pm 0,55	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	66,0 \pm 0,88	0,0 \pm 0,00
IBCB 171	16,0 \pm 2,31	68,0 \pm 1,40	50,0 \pm 14,67	22,0 \pm 1,32	98,0 \pm 0,30	94,1 \pm 5,31
IBCB 334	14,0 \pm 2,38	54,0 \pm 1,52	28,1 \pm 7,92	30,0 \pm 1,52	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 345	34,0 \pm 1,54	80,0 \pm 2,32	68,8 \pm 16,56	44,0 \pm 1,26	98,0 \pm 0,30	94,1 \pm 7,13
IBCB 347	50,0 \pm 3,55	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 4,56	50,0 \pm 1,80	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 348	44,0 \pm 1,03	78,0 \pm 0,60	65,6 \pm 4,01	54,0 \pm 1,63	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 353	24,0 \pm 3,55	58,0 \pm 2,50	34,4 \pm 15,32	44,0 \pm 1,03	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 374	38,0 \pm 1,15	84,0 \pm 1,91	75,0 \pm 16,51	44,0 \pm 0,49	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 380	48,0 \pm 1,31	90,0 \pm 0,36	84,4 \pm 6,96	50,0 \pm 1,31	94,0 \pm 0,60	82,4 \pm 11,80
IBCB 383	16,0 \pm 2,46	60,0 \pm 1,61	37,5 \pm 14,85	18,0 \pm 1,16	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 384	12,0 \pm 2,92	34,0 \pm 1,78	0,0 \pm 0,00	28,0 \pm 3,46	98,0 \pm 0,30	94,1 \pm 9,00
IBCB 391	14,0 \pm 2,24	62,0 \pm 1,90	40,6 \pm 15,05	28,0 \pm 0,53	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 437	20,0 \pm 2,87	70,0 \pm 1,80	53,1 \pm 9,95	26,0 \pm 1,71	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 438	10,0 \pm 2,62	64,0 \pm 1,90	43,8 \pm 11,32	16,0 \pm 1,23	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00

Tabela 2. Mortalidade acumulada (confirmada, total e corrigida) (\pm EP) (%) quatro e seis dias após a pulverização de isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* sobre ninfas de *M. fimbriolata*. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ UR) (n = 50 insetos)

Isolados	4 dias			6 dias		
	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida
Testemunha	0,0 \pm 0,00	60,0 \pm 0,56	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	90,0 \pm 0,67	0,0 \pm 0,00
IBCB 10	48,0 \pm 1,03	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	48,0 \pm 1,04	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 103	50,0 \pm 1,02	90,0 \pm 1,22	75,0 \pm 6,00	50,0 \pm 1,01	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 104	38,0 \pm 1,92	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	38,0 \pm 1,92	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 116	46,0 \pm 1,63	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	46,0 \pm 1,62	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 121	38,0 \pm 1,44	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	38,0 \pm 1,44	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 138	42,0 \pm 1,34	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	42,0 \pm 1,34	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 142	42,0 \pm 0,40	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	42,0 \pm 0,40	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 250	22,0 \pm 3,06	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	22,0 \pm 3,06	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 348	64,0 \pm 1,07	92,0 \pm 0,74	80,0 \pm 0,00	70,0 \pm 1,00	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 385	30,0 \pm 2,00	88,0 \pm 1,60	70,0 \pm 6,00	30,0 \pm 2,00	88,0 \pm 1,58	0,0 \pm 0,00
IBCB 462	40,0 \pm 0,00	98,0 \pm 0,36	95,0 \pm 6,00	40,0 \pm 0,40	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 470	44,0 \pm 0,49	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	44,0 \pm 0,49	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 471	44,0 \pm 0,85	98,0 \pm 0,30	95,0 \pm 0,00	44,0 \pm 0,84	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 472	50,0 \pm 0,86	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	50,0 \pm 0,86	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 474	18,0 \pm 3,47	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	18,0 \pm 3,47	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 475	46,0 \pm 0,40	98,0 \pm 0,30	95,0 \pm 6,00	48,0 \pm 0,61	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 479	50,0 \pm 1,03	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	50,0 \pm 0,86	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 481	30,0 \pm 1,10	98,0 \pm 0,30	95,0 \pm 0,00	30,0 \pm 1,09	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00

de insetos-praga de grãos armazenados. Os autores observaram grande variação nas mortalidades obtidas, isolados que foram totalmente ineficientes e outros que provocaram mortalidade confirmada de 100%. Almeida (1994) avaliou a patogenicidade de mais de cem isolados dos mesmos fungos ao cupim *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae), selecionando o isolado 634 de *B. bassiana* que causou alta mortalidade confirmada ao inseto e apresentou boa produção de conídios em diversos meios de cultura.

Os valores de mortalidade confirmada variaram de 16% (Tabela 1) a 88% (Tabela 5), seis dias após a inoculação para os 79 isolados testados. Apesar de os isolados IBCB 383, IBCB 384, IBCB 171, IBCB 391, IBCB 437, IBCB 438, IBCB 385, IBCB 250, IBCB 474 e IBCB 476 ocasionarem mortalidade total acima de 85% e mortalidade corrigida de 50% a 100%, seis dias após a inoculação, a mortalidade confirmada foi baixa (Tabelas 1 a 5). Porém, nem todos os insetos mortos apresentaram sinais característicos ou morreram com a penetração do fungo, o

que pode ser explicado devido à septicemia generalizada causada por bactérias, interferindo no crescimento vegetativo do fungo no interior dos insetos (Tabelas 1 a 5).

Dos 79 isolados testados, apenas 17 provocaram mortalidade total inferior a 70% no quarto dia após a pulverização (Tabelas 1 a 5). O aparecimento de insetos mortos ocorre, 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 outros fatores (Alves 1998).

A maioria dos 27 isolados provenientes de espécies de cigarrinha de diferentes regiões do País apresentou comportamento semelhante entre si, com baixos valores de mortalidade confirmada ao quarto e sexto dia, sendo que apenas os isolados IBCB 348 e IBCB 363 apresentaram mortalidade confirmada de 80% e 88%, respectivamente (Tabela 5). Assim, para permitir comparação mais acurada dos resultados de cada isolado, utilizou-se como padrão o isolado IBCB 348 em todos os bioensaios desse experimento.

Tabela 3. Mortalidade acumulada (confirmada, total e corrigida) (\pm EP) (%) quatro e seis dias após a pulverização de isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* sobre ninfas de *M. fimbriolata*. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ UR) (n = 50 insetos)

Isolados	4 dias			6 dias		
	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida
Testemunha	0,0 \pm 0,00	56,0 \pm 1,09	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	86,0 \pm 0,60	0,0 \pm 0,00
IBCB 333	42,0 \pm 0,98	92,0 \pm 0,56	81,8 \pm 10,23	48,0 \pm 1,08	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 348	60,0 \pm 0,56	94,0 \pm 0,60	86,4 \pm 10,94	64,0 \pm 0,42	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 358	42,0 \pm 1,78	86,0 \pm 0,60	68,2 \pm 3,66	52,0 \pm 1,53	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 361	34,0 \pm 1,89	90,0 \pm 0,96	77,3 \pm 17,75	40,0 \pm 1,43	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 362	44,0 \pm 1,62	84,0 \pm 1,17	63,6 \pm 12,33	48,0 \pm 1,17	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 364	42,0 \pm 1,46	88,0 \pm 0,60	72,7 \pm 8,86	44,0 \pm 1,61	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 417	38,0 \pm 2,34	86,0 \pm 1,17	68,2 \pm 2,74	50,0 \pm 2,48	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 423	28,0 \pm 3,51	82,0 \pm 0,58	59,1 \pm 11,41	34,0 \pm 2,22	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 425	46,0 \pm 1,59	66,0 \pm 0,88	22,7 \pm 8,50	70,0 \pm 1,50	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 426	48,0 \pm 1,17	80,0 \pm 1,01	54,5 \pm 11,99	52,0 \pm 1,17	88,0 \pm 0,75	14,3 \pm 14,35
IBCB 427	44,0 \pm 1,24	84,0 \pm 0,37	63,6 \pm 6,60	50,0 \pm 1,58	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 429	36,0 \pm 1,35	88,0 \pm 0,60	72,7 \pm 2,17	38,0 \pm 1,32	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 439	36,0 \pm 3,89	82,0 \pm 0,30	59,1 \pm 3,59	36,0 \pm 3,85	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
E 9	40,0 \pm 1,26	90,0 \pm 0,96	77,3 \pm 17,75	44,0 \pm 1,50	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
E 9 (19)	46,0 \pm 0,77	86,0 \pm 1,10	68,2 \pm 10,23	50,0 \pm 1,12	98,0 \pm 0,30	85,7 \pm 18,00
ESALQ 1037	38,0 \pm 0,80	82,0 \pm 0,90	59,1 \pm 14,90	48,0 \pm 1,17	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
E 601	40,0 \pm 0,67	82,0 \pm 1,16	59,1 \pm 14,97	46,0 \pm 1,04	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
N ^o 20-Unicamp	46,0 \pm 0,49	78,0 \pm 0,70	50,0 \pm 9,76	56,0 \pm 0,45	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
PL 26	44,0 \pm 1,50	86,0 \pm 1,17	68,2 \pm 10,23	50,0 \pm 0,86	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
PL 43	54,0 \pm 1,24	94,0 \pm 0,36	86,4 \pm 7,32	54,0 \pm 1,45	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
PL 49	48,0 \pm 0,72	88,0 \pm 0,90	72,7 \pm 14,85	56,0 \pm 0,45	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
SPL 358	52,0 \pm 1,18	84,0 \pm 0,37	63,6 \pm 4,90	56,0 \pm 0,77	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00

De acordo com Vestergaard *et al.* (1995), a patogenicidade independe do hospedeiro ou local de origem do isolado. A baixa porcentagem de mortalidade confirmada verificada nos bioensaios pode estar relacionada à variabilidade genética de cada isolado. O isolado IBCB 348 apresentou variações de mortalidade confirmada e total de 54% a 80% e 88% a 100%, respectivamente, ao sexto dia da aplicação. A mortalidade corrigida foi de 100%, em quatro, dos cinco bioensaios estudados (Tabelas 1 a 5). Essa variação pode ser explicada por conseqüências das diferenças de população, alterações no tempo de manipulação do inseto e outros fatores. O referido isolado já foi selecionado como promissor no programa de controle microbiano (Almeida *et al.* 2003), proporcionando altos níveis de controle de

até 85%, quando comparado aos resultados observados pelos produtos fitossanitários químicos (Almeida *et al.* 2002b, Batista Filho *et al.* 2002). Tamai (2002) observou que o isolado IBCB 348 promoveu mortalidade superior a 90% ao ácaro *T. urticae* Koch, cinco dias após a pulverização, em condições de laboratório.

Os isolados PL 43, E 9, ESALQ 1037 e IBCB 10 causaram mortalidade total, quatro dias após a pulverização, de 94, 90, 82 e 100% e baixos valores de mortalidade confirmada (Tabelas 2 e 3), não sendo selecionados para o controle de ninfas de *M. fimbriolata*. Em estudos com a espécie *M. posticata* os isolados PL 43 e PL 26 causaram 86% de mortalidade (IAA/PLANALSUCAR 1982).

Tabela 4. Mortalidade acumulada (confirmada, total e corrigida) (\pm EP) (%) quatro e seis dias após a pulverização de isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* sobre ninfas de *M. fimbriolata*. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ UR) (n = 50 insetos)

Isolados	4 dias			6 dias		
	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida
Testemunha	0,0 \pm 0,00	48,0 \pm 1,17	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	88,0 \pm 0,75	0,0 \pm 0,00
IBCB 348	34,0 \pm 1,17	46,0 \pm 1,74	0,0 \pm 9,00	66,0 \pm 0,66	88,0 \pm 1,16	0,0 \pm 0,00
IBCB 351	38,0 \pm 1,76	50,0 \pm 1,55	3,8 \pm 11,27	70,0 \pm 1,56	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 382	36,0 \pm 0,86	60,0 \pm 0,94	23,1 \pm 11,86	56,0 \pm 0,45	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 400	34,0 \pm 1,78	66,0 \pm 1,61	34,6 \pm 10,96	48,0 \pm 1,17	94,0 \pm 0,60	50,0 \pm 18,60
IBCB 420	42,0 \pm 0,79	94,0 \pm 0,92	88,5 \pm 12,00	44,0 \pm 0,84	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 428	26,0 \pm 1,11	48,0 \pm 0,96	0,0 \pm 0,00	44,0 \pm 1,30	92,0 \pm 0,89	33,3 \pm 20,21
IBCB 439	40,0 \pm 1,04	92,0 \pm 0,56	84,6 \pm 7,52	44,0 \pm 1,47	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 440	38,0 \pm 1,76	50,0 \pm 1,55	3,8 \pm 11,27	40,0 \pm 1,54	88,0 \pm 1,41	0,0 \pm 0,0
IBCB 476	8,0 \pm 2,35	48,0 \pm 1,42	0,0 \pm 0,00	18,0 \pm 1,16	94,0 \pm 0,36	50,0 \pm 18,60
IBCB 477	38,0 \pm 1,71	84,0 \pm 0,37	69,2 \pm 9,10	40,0 \pm 1,30	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 480	32,0 \pm 2,00	84,0 \pm 1,51	69,2 \pm 12,66	36,0 \pm 2,24	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 489	32,0 \pm 2,00	58,0 \pm 2,22	19,2 \pm 9,50	48,0 \pm 1,17	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00

Os isolados IBCB 425 (Tabela 3), IBCB 351 (Tabela 4) e IBCB 348, IBCB 363, IBCB 408, IBCB 410, IBCB 418 e IBCB 482 (Tabela 5) causaram mortalidade confirmada acima de 70%. Ocorreu um aumento considerável na taxa de mortalidade confirmada das ninfas após o quarto dia da inoculação. A capacidade de produção de um isolado é um aspecto importante que pode levar ao desencadeamento de epizootias em campo, pois em condições ambientais

favoráveis, mantém ou aumenta o potencial de inóculo em uma determinada área (Alves & Lecuona 1998). Foi possível observar, no quarto dia após a inoculação, ninfas de cigarrinhas com sintomas de infecção, as quais em poucas horas depois seriam mortas pelo patógeno. Esse fato pode ser explicado pelas características do microrganismo, como tempo de germinação e colonização, que são variáveis e podem determinar a virulência do isolado e o

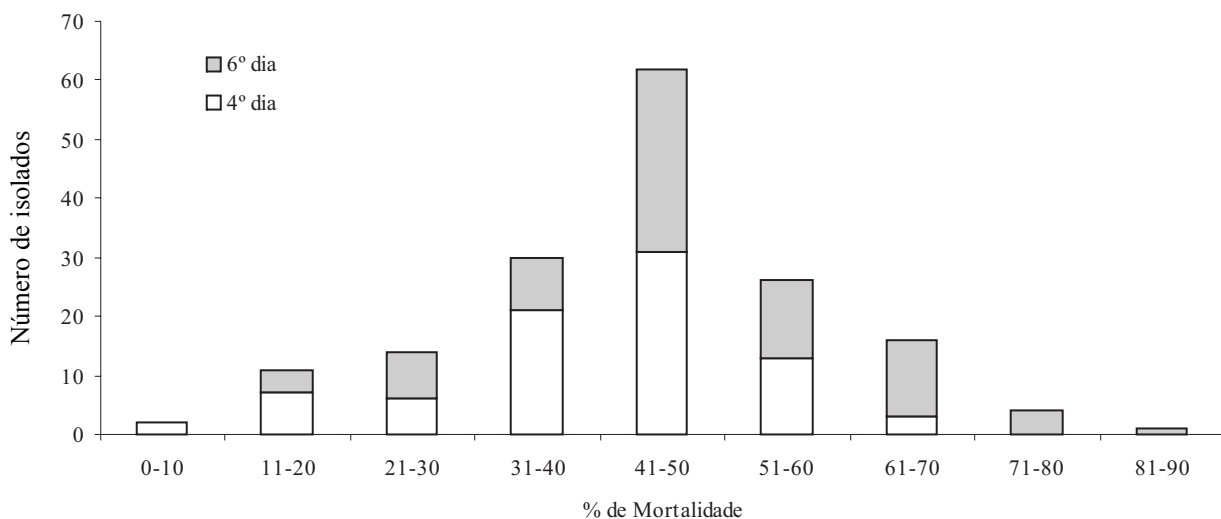


Figura 2. Distribuição de frequência de isolados de *M. anisopliae* em relação à mortalidade confirmada causada em ninfas de *M. fimbriolata*. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ UR).

Tabela 5. Mortalidade acumulada (confirmada, total e corrigida) (\pm EP) (%) quatro e seis dias após a pulverização de isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* sobre ninfas de *M. fimbriolata*. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h e $70 \pm 10\%$ UR) (n = 50 insetos)

Isolados	4 dias			6 dias		
	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida	Mortalidade confirmada	Mortalidade total	Mortalidade corrigida
Testemunha	0,0 \pm 0,00	52,0 \pm 0,71	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	88,0 \pm 0,75	0,0 \pm 0,00
IBCB 160	48,0 \pm 0,73	88,0 \pm 0,73	75,0 \pm 11,02	56,0 \pm 0,71	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 323	54,0 \pm 1,57	82,0 \pm 2,00	62,5 \pm 18,60	62,0 \pm 0,66	98,0 \pm 0,30	83,3 \pm 18,00
IBCB 348	70,0 \pm 0,66	86,0 \pm 1,10	70,8 \pm 14,93	80,0 \pm 0,70	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 363	54,0 \pm 2,10	60,0 \pm 2,48	16,7 \pm 10,87	88,0 \pm 0,89	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 390	40,0 \pm 0,95	64,0 \pm 1,34	25,0 \pm 11,41	64,0 \pm 1,92	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 398	44,0 \pm 1,61	76,0 \pm 1,51	50,0 \pm 14,78	60,0 \pm 1,74	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 407	46,0 \pm 1,24	78,0 \pm 0,63	54,2 \pm 5,33	62,0 \pm 0,60	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 408	52,0 \pm 0,00	84,0 \pm 0,77	66,7 \pm 2,86	70,0 \pm 0,67	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 410	62,0 \pm 0,66	80,0 \pm 0,62	58,3 \pm 5,30	80,0 \pm 0,70	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 411	52,0 \pm 1,30	82,0 \pm 2,00	62,5 \pm 18,97	64,0 \pm 1,04	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 412	42,0 \pm 0,80	90,0 \pm 0,67	79,2 \pm 9,63	48,0 \pm 0,73	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 414	56,0 \pm 0,95	84,0 \pm 1,69	66,7 \pm 12,60	66,0 \pm 0,42	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 416	46,0 \pm 1,64	78,0 \pm 1,64	54,2 \pm 17,88	60,0 \pm 2,25	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 418	58,0 \pm 1,34	74,0 \pm 1,35	45,8 \pm 9,22	78,0 \pm 0,90	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 419	52,0 \pm 1,43	78,0 \pm 1,87	54,2 \pm 15,00	60,0 \pm 0,42	92,0 \pm 0,89	33,3 \pm 9,49
IBCB 478	48,0 \pm 1,17	74,0 \pm 1,18	45,8 \pm 14,82	64,0 \pm 1,16	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
IBCB 482	58,0 \pm 0,45	78,0 \pm 1,19	54,2 \pm 12,66	80,0 \pm 0,70	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
BC 248	52,0 \pm 1,31	90,0 \pm 0,96	79,2 \pm 12,59	58,0 \pm 1,18	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
BC 249	54,0 \pm 0,76	80,0 \pm 0,50	58,3 \pm 5,60	64,0 \pm 0,87	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00

tempo necessário para que promova a morte do hospedeiro (Alves 1998).

Os isolados IBCB 348, IBCB 351, IBCB 363, IBCB 408, IBCB 410, IBCB 418, IBCB 425 e IBCB 482 causaram baixa mortalidade total no 4º dia após a pulverização (Tabelas 4, 5 e 6). Segundo Pacola-Meirelles & Azevedo (1990), Kleespies & Zimmermann (1994) a variabilidade entre isolados é resultado das diferenças na produção de enzimas (amilase, protease, lipase) e toxinas, na velocidade de germinação dos conídios, na atividade mecânica de penetração na cutícula e na capacidade de colonização dos isolados.

No presente estudo, verificou-se que a maioria dos isolados causou mortalidade confirmada entre 41% e 50% aos 4º e 6º dias, respectivamente, após a pulverização sobre as ninfas de *M. fimbriolata*. 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 de 81% a 90% (Fig. 2).

Os isolados selecionados, que proporcionaram mortalidade confirmada superior ou igual a 70% no sexto dia de observação, foram IBCB 348, IBCB 351, IBCB 363, IBCB 408, IBCB 410, IBCB 418, IBCB 425, IBCB 482 (Tabelas 1, 4 e 5). Embora os oito isolados de *M. anisopliae* tenham proporcionado alta patogenicidade, outras características desejáveis precisam ser estudadas para que os mesmos possam ser utilizados nas formulações de produtos para o controle de *M. fimbriolata*. Uma dessas características é a máxima produção de conídios.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro desta pesquisa e ao Instituto Biológico pela cessão das instalações para a condução dos experimentos de laboratório.

Literatura Citada

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Almeida, J.E.M. 1994.** Avaliação de fungos entomopatogênicos visando ao controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae). Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, 105p.
- Almeida, J.E.M., A. Batista Filho & A.S. Santos. 2002a.** Controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos.* 21: 84-89.
- Almeida, J.E.M., A. Batista Filho, A.S. Santos, L.G. Leite & S.B. Alves. 2003.** Controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hem.: Cercopidae), em cana cultivada no sistema orgânico. *STAB Açúcar, Álcool Subprod.* 22: 34-37.
- Almeida, J.E.M., A. Batista Filho & L.G. Leite. 2002b.** Controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hem.: Cercopidae) em cana cultivada no sistema orgânico. *STAB Açúcar, Álcool Subprod.* 21: 79-83.
- Almeida, J.E.M., S.B. Alves & R.M. Pereira, 1997.** Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). *J. Appl. Entomol.* 121: 539-543.
- Alves, S.B. 1998.** (ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. & R.E. Lecuona. 1998.** (eds.) Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p.97-163. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Batista Filho, A., J.E.M. Almeida & L.A. Machado. 2002.** Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). *STAB Açúcar, Álcool Subprod.* 21: 84-89.
- Dinardo-Miranda, L.L., J.M.G. Ferreira & P.A.M. Carvalho. 2001.** Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotrop. Entomol.* 30: 145-149.
- IAA/PLANALSUCAR. 1982.** Relatório anual: Programa nacional de melhoramento da cana-de-açúcar. p.11-116.
- Kleespies, R.G. & G. Zimmermann. 1994.** Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. *Bioc. Sci. Tech.* 4: 309-319.
- Moino Jr., A. 1993.** Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de pragas de grãos armazenados. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, 100p.
- Neves, P.M.J. 1998.** Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera, Termitidae). Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, 113p.
- Pacola-Meirelles, L.D. & J.L. Azevedo. 1990.** Variabilidade natural do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Arq. Bio. Tecn.* 33: 657-672.
- Tamai, M.A. 2002.** Controle de *Tetranychus urticae* Koch fungos entomopatogênicos. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, 120p.
- Vestergaard, S. 1995.** Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western thrips, *Fankliniella occidentalis*. *Bioc. Sci. and Tech.* 5: 185-192.

Received 12/XI/04. Accepted 06/VI/05.