

EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE FORMAS IMATURAS DE

Diatraea flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ELLEN CARINE NEVES VALENTE

(Sob orientação do Professor Edmilson Jacinto Marques)

RESUMO

Diatraea flavipennella (Box), é uma praga de grande importância econômica para a cultura da cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. O emprego do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) não tem sido suficiente no controle desta praga. O uso de fungos entomopatogênicos é uma alternativa viável dentro do contexto do manejo integrado dessa praga. Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito dos isolados URPE-3, URPE-4, URPE-18, URPE-22 e ESALQ 447 de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman e PL43, E9, ESALQ 1189, URPE-11 e URPE-19 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos de 24, 48 e 72 horas de idade e lagartas no 2º ínstar de *D. flavipennella*. Os ovos e lagartas foram pulverizados com 1mL das suspensões (1×10^7 conídios/mL) (tratamentos) e água destilada e esterilizada mais espalhante adesivo Tween® 80 a 0,01% (testemunha). Os ensaios realizados com ovos de *D. flavipennella* constaram de quatro repetições, sendo composta por aproximadamente 30 ovos cada. Os ensaios com as lagartas constaram de seis repetições, sendo cada uma composta por sete lagartas, totalizando 42 lagartas por tratamento. Ovos e lagartas foram mantidos em B.O.D. a $27 \pm 1^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ UR; 12h de fotofase. O fungo *M. anisopliae* foi mais virulento para os ovos, destacando-se o isolado URPE-11, o qual proporcionou 100% de infecção nos ovos de 24, 48 e 72 horas de idade, sendo a CL_{50} estimada em $2,0 \times 10^5$ conídios/mL. Os isolados ESALQ 447 e ESALQ 1189

foram mais virulentos sobre lagartas da broca, apresentando valores médios de sobrevivência de 5,76 e 3,23 dias, respectivamente. A CL_{50} para estes isolados foi estimada em $1,2 \times 10^7$ conídios/mL. Os resultados indicam que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são importantes para serem utilizados no Manejo Integrado de *D. flavipennella* contribuindo para a sustentabilidade da agricultura canavieira no nordeste do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Broca da cana-de-açúcar, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

EFFECT OF ENTOMOPATOGENIC FUNGI ON IMMATURE FORMS OF *Diatraea*

flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

by

ELLEN CARINE NEVES VALENTE

(Under the Direction of Professor Edmilson Jacinto Marques)

ABSTRACT

Diatraea flavipennella (Box), is a pest of great economic importance to the cultivation of sugar cane in Northeast Brazil. The use of the larval parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam) has not succeeded in controlling the *D. flavipennella*. The use of entomopathogenic fungi is a viable alternative within the context of integrated management of this pest. Thus, this study aimed to evaluate the effect of isolated URPE-3, URPE-4, URPE-18, URPE-22, and ESALQ 447 of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman and PL43, E9, ESALQ 1189, URPE-11, and URPE-19 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on eggs of 24, 48, and 72 hours old and the 2nd-instar larvae of *D. flavipennella* in laboratory conditions. The eggs and larvae were sprayed with 1 mL of suspensions (1×10^7 conidia / mL) (treatment) and sterile distilled water over wetting agent Tween[®] 80 at 0.01% (control). Tests conducted on eggs of *D. flavipennella* consisted of four replications, each consisting of approximately 30 eggs. The experiments with caterpillars consisted of six replications, each consisting of seven larvae, totaling 42 larvae per treatment. Eggs and larvae were kept inside of growth chamber at 27 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ RH and 12h photophase. The fungus *M. anisopliae* was more virulent to eggs, particularly the isolated URPE-11, which provided 100% of infection in eggs of 24, 48, and 72 hours old, and the LC₅₀ at 2.0×10^5 conidia. The isolates ESALQ 447 and ESALQ 1189 were more virulent to borer larvae,

with mean survival values of 5.76 and 3.23 days, respectively. The LC₅₀ for these isolates was estimated at 1.2×10^7 conidia. The results suggest that the fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana* are important for further evaluation in the applied integrated management of *D. flavipennella* contributing to the sustainability of sugarcane production in northeastern Brazil.

KEY WORDS: Sugarcane borer, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE FORMAS IMATURAS DE

Diatraea flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Por

ELLEN CARINE NEVES VALENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Entomologia Agrícola

RECIFE - PE

Fevereiro – 2011

EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS SOBRE FORMAS IMATURAS DE

Diatraea flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ELLEN CARINE NEVES VALENTE

Comitê de Orientação:

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

José Vargas de Oliveira - UFRPE

Reginaldo Barros - UFRPE

EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS SOBRE FORMAS IMATURAS DE

Diatraea flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ELLEN CARINE NEVES VALENTE

Orientador:

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

Examinadores:

José Vargas de Oliveira – UFRPE

Auristela Correia Albuquerque – UFRPE

Ivanildo Soares de Lima - UFAL

Aos meus pais José Edson Valente Costa e

Cleonilda Neves Valente

DEDICO

As minhas irmãs Bertha Carolina e Jenna Kadja

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a espiritualidade, por serem as luzes que iluminam minha vida e socorrem nas horas de angústia e de preocupações. Pelas bênçãos alcançadas e por toda proteção.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação de Entomologia Agrícola pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

À Usina Central Olho D'água, que através do Eng^o Agrônomo Marcos Ferreira de Mendonça, forneceu apoio durante as coletas de material em campo.

Ao Eng^o Agrônomo MSc Ricardo Otaviano Ribeiro de Lima, pelo fornecimento de cana-de-açúcar da Estação Experimental de Cana de açúcar de Carpina (EECAC) para realização dos experimentos.

À Professora Sônia M. Forti Broglio-Micheletti (UFAL) pela amizade, incentivo e exemplo.

Ao Professor Edmilson J. Marques, pela disponibilidade em dividir sua experiência ajudando-me na aquisição de novos conhecimentos, que foram imprescindíveis para realização desse trabalho.

Ao Professor José Vargas, pela amizade e contribuição durante o curso.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE pelos conhecimentos transmitidos.

À meu pai, pelo exemplo de honestidade e por mostrar que a maior herança que um filho pode ter é o estudo.

À minha querida mãe, pela dedicação e apoio, ajudando a tornar um sonho em realidade.

As minhas irmãs, Bertha Carolina e Jenna Kadja, pela torcida e amizade sincera.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Insetos, Cinthia, Eliana, Jennifer, Ricardo, Rodrigo, Marco e Dávila, pela amizade e auxílio.

À Cinthia Matias, pela amizade e apoio imprescindível para a realização deste trabalho.

À Eliana Passos, pela amizade, dedicação e grandiosa ajuda neste trabalho, me amparando nos momentos de dificuldades e preocupações.

Aos amigos, Meire, Felipe, Luziane, Vanessa, Wellington, Andresa, Cleozita, Lili, Agna, Martin, Flávia, Mário, Aleuny, Solange, Erika e Karla.

Aos colegas, que contribuíram de alguma forma neste trabalho, seja carregando cana ou pelos momentos de descontração.

Que o Senhor traduza meus agradecimentos a todos em renovadas bênçãos de alegria e paz!

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	viii
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA.....	06
2 EFEITO DE ISOLADOS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROK E <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL. SOBRE OVOS E LAGARTAS DE <i>Diatraea flavipennella</i> (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	09
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
AGRADECIMENTOS	22
LITERATURA CITADA	23

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp. L., é uma monocotiledônea de origem asiática pertencente à família Poaceae. No Brasil, com a colonização portuguesa, caracterizou-se como umas das primeiras culturas introduzidas no país com fins lucrativos (Lucchesi 2001). Atualmente, o país destaca-se como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo seguido da Índia, China, Tailândia, Paquistão, México e Colômbia (FAOSTAT 2008).

O Estado de São Paulo é o maior produtor da cultura com 53,60% de área colhida, seguido por Minas Gerais (8,65%), Paraná (7,51%), Goiás (7,34%), Alagoas (5,37%), Mato Grosso do Sul (4,92%) e Pernambuco (4,21%). Esses Estados exercem um importante papel no cenário econômico brasileiro, devido à produção de açúcar e etanol, gerando aumento de divisas para o país, e em menor escala na alimentação animal e fabricação de aguardente (CONAB 2010).

Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2010), a safra 2010/11 somará 651, 514 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, em uma área de 8,17 milhões de hectares, com produtividade de 79,76 t/ha. O montante de cana a ser processado na região Nordeste para esta safra será de 63,67 milhões de toneladas, representando 13,55% da área colhida no país.

Dentre os fatores bióticos que limitam o desenvolvimento fisiológico da cana-de-açúcar, destacam-se a incidência de insetos-praga, dos quais estão a cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* Stal., cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* Stal., a broca gigante *Telchin licus licus* (Drury) e as brocas do gênero *Diatraea* spp. (Castro & Christoffoletti 2005, Marques *et al.* 2009).

Cerca de 21 espécies de *Diatraea* estão distribuídas nos canaviais do Continente americano. No entanto, apenas algumas apresentam danos econômicos à cultura. No Brasil, *Diatraea*

saccharalis (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box) infestam a cana-de-açúcar sendo a primeira de distribuição generalizada em todo o país, enquanto a segunda restringe-se apenas aos canaviais dos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, e no Norte e Nordeste do país (Mendonça *et al.* 1996, Pinto 2006).

A broca da cabeça amarela da cana-de-açúcar, *D. flavipennella*, uma das pragas pertencentes ao complexo de brocas do gênero *Diatraea* spp., é de grande importância econômica para a cultura e seu desenvolvimento bastante irregular, depende de inúmeros fatores como clima e a planta hospedeira (Guagliumi 1972-73). As fêmeas depositam cerca de 430 ovos no limbo foliar, geralmente na face dorsal, em grupos e de forma imbricada. Possuem forma elíptica e coloração amarelada, quando os embriões estão maduros, tornando-se escuros, quando são visíveis as cápsulas cefálicas das lagartas no interior dos mesmos (Mendonça *et al.* 1996, Freitas *et al.* 2007).

Após a eclosão, as lagartas neonatas se deslocam de uma folha a outra penduradas por fio de seda, alimentando-se, inicialmente, do parênquima foliar, fazendo galerias na nervura central. Depois de efetuarem as primeiras ecdises, penetram no colmo, procurando as partes mais moles, na base do cartucho ou na região das gemas. O inseto passa por um número variável de ecdises, quando então inicia a perfuração do colmo, esta fase tem uma duração média de 35 dias e apresenta sete instares (Mendonça *et al.* 1996, Freitas *et al.* 2007).

A lagarta de *D. flavipennella* apresenta coloração amarelada com manchas castanhas dispostas de forma desuniforme, sem formação de linhas no dorso. A cápsula cefálica possui cor amarelada ou marrom amarelada (Mendonça *et al.* 1996). A pupa, de coloração marrom, é encontrada no colmo, no interior das galerias abertas pela lagarta. O estágio pupal dura em média 13 dias e a razão sexual é de 1:1,3 (Freitas *et al.* 2007).

A cana-de-açúcar está sujeita ao ataque dessa praga durante todo o seu desenvolvimento. Como tendência geral, as canas-plantas sofrem ataques mais severos, quando comparadas às socas considerando que, as canas jovens possuem maior vigor vegetativo e estão expostas à praga por mais tempo. Além disso, nos canaviais com canas novas a atuação dos inimigos naturais é menor devido a desestruturação dos canaviais por ocasião das práticas culturais realizadas para a implantação da lavoura (Parra *et al.* 2002).

A fase larval causa danos diretos, caracterizados pela morte da gema apical conhecido como “coração morto”, em plantas jovens de dois a quatro meses, bem como perda de peso da cana, falhas na germinação, enraizamento aéreo, tombamento e brotações laterais em plantas adultas, acarretando na redução do rendimento agrícola (Mendonça *et al.* 1996).

Os orifícios abertos pelas lagartas facilitam a infecção pelos fungos *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon), acarretando em danos indiretos por meio do desenvolvimento da doença conhecida como podridão vermelha do colmo. Esta é responsável pela inversão da sacarose armazenada na planta, redução da pureza do caldo e contaminação no processo de fermentação alcoólica, fatores que desencadeiam na queda do rendimento industrial (Gallo *et al.* 2002, Pinto 2006). Segundo White *et al.* (2008), as lagartas acarretam perdas de até 0,30% de açúcar/ha para cada 1% de entrenós brocados, uma vez que atuam, principalmente, na redução da qualidade da matéria prima, por meio da inversão da sacarose. O manejo fitossanitário de *D. flavipennella* é dificultado pelo comportamento da praga, a qual permanece a maior parte do seu desenvolvimento no interior do colmo (Pinto 2006). O controle biológico natural da broca por meio da atuação dos artrópodes ocorre sobre todas as fases de desenvolvimento do inseto, sendo a participação mais significativa na fase de ovo. Além da ação dos inimigos naturais, o clima também atua sobre essa fase do ciclo, contribuindo para reduzir o número de ovos viáveis. Após a eclosão, a lagarta também está sujeita a ação desses

controladores, que agem principalmente até a penetração desta no entrenó. O controle natural nesta fase gira em torno de 20% (Botelho & Macedo 2002).

O controle biológico de *Diatraea* spp com o parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) tem sido empregado desde 1974 no Brasil através da criação e liberações inundativas em canaviais infestados (Mendonça *et al.* 1996). A liberação das vespínhas é realizada nas situações em que o monitoramento da praga indicar médias superiores a 10 lagartas/hora/homem, ou com população estimada em 2500 lagartas/ha (Botelho & Macedo 2002).

O controle químico pode ser empregado na situação em que houver 3% de canas com lagartas recém-eclodidas no cartucho, antes da penetração no colmo da planta. Neste sentido, são realizadas pulverizações com inseticidas reguladores de crescimento visando à região do palmito da planta (Gallo *et al.* 2002).

A broca *D. saccharalis* é ainda suscetível aos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., os quais ocorrem naturalmente infectando cerca de 10% das larvas, nas condições do Nordeste do Brasil (Alves *et al.* 2008). Estes fungos, são os mais estudados para o controle de pragas, e isso se deve a sua ampla distribuição geográfica, variedade de hospedeiros e ocorrência enzootica ou epizootica em algumas espécies de insetos pragas (Alves 1998), inclusive lepidópteros, como *Plutella xylostella* (L.) (Silva *et al.* 2003), *Alabama argillacea* (Huebner) (César Filho *et al.* 2002) e *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Bing & Lewis 1993).

O fungo *M. anisopliae* é o mais produzido e utilizado no Brasil visando o controle da cigarrinha-da-folha, *M. posticata* e cigarrinha-da-raiz, *M. fimbriolata* nas regiões Nordeste e Sudeste (Pinto 2006). Estudando isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* Figuêredo *et al.* (2002) demonstraram patogenicidade para a fase larval da broca gigante *T. licus licus*. Da mesma forma,

quando aplicados via água de irrigação mostraram-se patogênicos para *Hyponeuma taltula* (Schaus) (Viveiros *et al.* 2008).

Segundo Mendonça *et al.* (1996), ovos e lagartas recém eclodidas de *Diatraea* spp. são facilmente controlados pelo fungo *M. anisopliae*, uma vez que, quando em condições climáticas favoráveis de umidade e temperatura favorecem a atuação do patógeno, possibilitando o desenvolvimento de epizootias. A utilização de diferentes concentrações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre lagartas de *D. saccharalis* demonstrou que além de patogênicos às lagartas desta praga, estes fungos também interferem negativamente na sua biologia (Oliveira *et al.* 2008).

Apesar da ampla utilização de *C. flavipes* para o controle de *Diatraea* spp., observa-se nos canaviais nordestinos uma predominância da espécie *D. flavipennella* (Freitas *et al.* 2006), demonstrando a necessidade da inclusão de outras formas de controle. Assim sendo, a exemplo do referido para a espécie *D. saccharalis*, o conhecimento da eficiência de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre a broca, *D. flavipennella* é de grande importância para alcançar esse objetivo, considerando que a introdução de mais um agente de controle biológico contribuirá para sustentabilidade da agricultura canavieira no nordeste do Brasil.

Literatura Citada

Alves, S.B. 1998. Fungos Entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

Alves, S.B., R.B. Lopes, S.A. Vieira & M.A. Tamai. 2008. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina, p.69-110. In S.B. Alves & R.B. Lopes (eds.), Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba, FEALQ, 414 p.

- Bing L.A. & L.C. Lewis. 1993.** Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Agric. Ecos. Environ.* 45: 147-156.
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 409-447. In J.R.P. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), *Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. São Paulo, Manole, 609p.
- Castro, P.R.C & P.J. Christoffoletti. 2005.** Fisiologia da cana de açúcar. p.3-48. In Mendonça, A.F. (ed.), *Cigarrinhas da cana-de-açúcar: Controle Biológico*. Maceió, Insecta, 317p.
- César Filho, E., E.J. Marques & R. Barros. 2002.** Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) caterpillars. *Scientia Agric.* 59: 457-462.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2010.** Safra da cana-de-açúcar. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso: 17/10/2010.
- FAOSTAT. 2008.** Sugarcane production. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso: 21/11/2010.
- Figueirêdo, M.F.S., E.J. Marques, R.O.R. Lima & J.V. Oliveira. 2002.** 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). *Neotrop. Entomol.* 31: 397- 403.
- Freitas, M.R., A.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R. Nascimento, A.E. Santana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the states of Alagoas, Brazil. *Fla. Entomol.* 89: 539-540.

- Freitas, M.R.T, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.P. Fonseca, A.L. Mendonça, J.S. Santos, R.R. Nascimento, A.E.G. Sant'ana. 2007.** The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. Fla. Entomol. 90: 309-313.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Guagliumi, P. 1972/73.** Pragas da Cana-de-açúcar (Nordeste do Brasil). Instituto do Açúcar e do Álcool, Rio de Janeiro, 622p.
- Lucchesi, A.A. 2001.** Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), p. 13-45. In P.R.C. Castro, R.A, Kluge (eds.), Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira. Cosmópolis, Stoller do Brasil, 138p.
- Marques, E.J., R.O.R. Lima, J.V. Oliveira. 2009.** Pragas da cana-de-açúcar: nordeste do Brasil. Recife, EDUFRPE, 54p.
- Mendonça, A.F., A.S. Seregatte, F.A. Moraes, W.H. Oliveira. 1996.** Manejo integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep.: Pyralidae) na Agroserra, Maranhão, Brasil, p. 219-225. In A. F. MENDONÇA (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 200p.
- Oliveira, M.A.P.; E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira & R. Barros. 2008.** Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). Acta Sci. Biol. 30: 220-224.
- Parra, J.R.P., P. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J. Bento. 2002.** Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo, Manole, 586p.
- Pinto, A.S. 2006.** Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho, Biocontrol, 64p.

- Silva, V.C.A, R. Barros, E.J. Marques & J.B. Torres. 2003.** Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos Fungos *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Neotrop. Entomol. 32: 653-658.
- Viveiros, A. J. A., J.S. Santos, S.H. Risco, G.V.S. Barbosa, C. Coletti, M.M. Cruz. 2008.** Eficiência de fungos entomopatogênicos e inseticidas, no controle de *Hyponeuma taltula* (Lepidoptera: Noctuidae), aplicados via água de irrigação. In Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, IX. Maceió, AL. Anais, p. 99-102.
- White, W.H., R.P. Viator, E.O. Dufrene, C.D. Dalley, E.P. Richard Jr.,T.L. Tew. 2008.** Re-evaluation of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) bioeconomics in Louisiana. Crop Prot. 27: 1256– 1261.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK E *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. SOBRE OVOS E LAGARTAS DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)¹

ELLEN C. N. VALENTE², EDMILSON J. MARQUES², JOSÉ V. OLIVEIRA², REGINALDO BARROS²,
ELIANA M. PASSOS², CINTHIA C. M. SILVA²

² Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE.

¹Valente, E.C.N., E.J. Marques, J.V.Oliveira, E.M. Passos, C.C.M. Silva. Efeito de isolados de *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. sobre formas imaturas de *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). A ser submetido.

RESUMO – A broca, *Diatraea flavipennella* (Box), constitui uma das principais pragas que acomete a cultura da cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. A liberação do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) tem sido a principal forma de controle desta praga, no entanto tem se mostrado insuficiente. Dessa forma, o presente trabalho objetivou estudar alternativas de controle por meio da seleção dos isolados URPE-3, URPE-4, URPE-18, URPE-22 e ESALQ 447 de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman e de PL 43, E9, ESALQ 1189, URPE-11 e URPE-19 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin na concentração 10^7 conídios/mL sobre ovos de 24, 48 e 72 horas de idade e lagartas no 2º instar. Os isolados de *M. anisopliae* testados causaram 100% de infecção sobre ovos de 24 e 48 horas de idade, sendo que o isolado URPE-11 manteve a infecção nos ovos de 72 horas. Este isolado foi selecionado para determinação da concentração letal (CL_{50}) sobre ovos da praga, sendo esta estimada em $2,0 \times 10^5$ conídios/mL. Os isolados ESALQ 447 de *B. bassiana*, E9 e ESALQ 1189 de *M. anisopliae* causaram mortalidades médias de lagartas de 70,8, 72,2 e 61,2%, respectivamente. Em relação à sobrevivência das lagartas, os isolados ESALQ 447 e ESALQ 1189 foram mais virulentos, com valores médios de 5,79 e 3,23 dias, respectivamente. A concentração letal (CL_{50}) para estes isolados foi estimada em $1,2 \times 10^7$ conídios/mL. Pode-se concluir que, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são patogênicos a ovos e lagartas da broca *D. flavipennella*, sendo assim, apresentam potencial para serem incrementados no programa de controle desta praga.

PALAVRAS-CHAVE: Broca da cana-de-açúcar, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

EFFECT OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Soroka AND *Beauveria bassiana* (Bals.)
Vuill. ISOLATES ON EGGS AND CATERPILLARS OF *Diatraea flavipennella* (BOX)
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ABSTRACT – The sugarcane borer, *Diatraea flavipennella* (Box), is a major pest that affects the sugarcane crops from the Northeast Brazil. The release of the larval parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam.) has been the major way to control this pest, however has proved insufficient. Thus, this study aimed to investigate alternative control through the selection of isolates URPE-3, URPE-4, URPE-18, URPE-22, and ESALQ 447 of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman and PL 43, E9, ESALQ 1189, URPE-11, and URPE-19 of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, with activity at concentration 10^7 conidia / mL on eggs of 24, 48, and 72 hours old, and in the second instar larvae development. The isolates of *M. anisopliae* tested caused 100% infection on eggs of 24 and 48 hours old, and isolate URPE-11 continued the infection in the eggs 72 hours. This isolate was selected for determination of lethal concentration (LC_{50}) on eggs of the pest, which is estimated at 2.0×10^5 conidia. ESALQ 447 and ESALQ 1189 isolates of *B. bassiana* and E9 of *M. anisopliae* caused average larvae mortalities of 70.8, 72.2, and 61.2% respectively. In regards to larval survival, the isolates ESALQ 447 and ESALQ 1189 were more virulent, with average values of 5.79 and 3.23 days, respectively. The lethal concentration (LC_{50}) for these isolates was estimated at 1.2×10^7 conidia. It can be concluded that the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* are pathogenic to eggs and larvae of the borer *D. flavipennella*, thus, they have the potential to enhance the biocontrol program of this pest.

KEYWORDS: Sugarcane borer, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

Introdução

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp., é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae e, nativa das regiões tropicais, cujo cultivo se estende aos dois hemisfério (Lucchesi 2001, Cesnick & Miocque 2004). No Brasil, as regiões produtoras desta cultura abrangem o Estado de São Paulo, Paraná, triângulo mineiro e zona da mata nordestina (MAPA 2010).

O Brasil é responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, estimando-se que a produção nacional alcance a taxa média de aumento de 3,25% até 2018/19 com um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas. Além da produção do açúcar, o país é referência mundial na produção de agroenergia, programas como os do etanol e biodiesel ofertam alternativas econômicas e ecologicamente viáveis à substituição dos combustíveis fósseis (MAPA 2010).

A facilidade de adaptação às condições edafoclimáticas do país, aliada à tecnologia aplicada ao cultivo da cana-de-açúcar, não impedem os problemas fitossanitários que acometem a cultura durante todo período de desenvolvimento vegetativo, limitando, assim, a produção. A incidência de insetos-pragas, tais como as cigarrinhas da folha *Mahanarva posticata* Stal., cigarrinhas-da-raiz *M. fimbriolata* Stal., a broca gigante *Telchin licus licus* (Drury) e as brocas do gênero *Diatraea* spp acarretam em prejuízos econômicos aos produtores (Castro & Christoffoletti 2005, Marques *et al.* 2009).

As brocas da cana-de-açúcar, *Diatraea* spp são pragas importantes nos canaviais do Continente Americano. No Brasil, as espécies *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *D. flavipennella* (Box) infestam a cana-de-açúcar, sendo a primeira de distribuição generalizada em todo o país,

enquanto a segunda está restrita apenas aos canaviais dos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e no Norte e Nordeste do país (Mendonça *et al.* 1996, Pinto 2006).

Os danos provocados por essa praga podem ser classificados em diretos e indiretos. Os primeiros são caracterizados pela abertura de galerias, perda de peso, morte das gemas, tombamento de plantas pelo vento e secamento dos ponteiros (coração morto). Os indiretos e mais consideráveis, são devido à penetração de fungos, *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon), através dos orifícios e galerias, ocasionando a podridão vermelha do colmo. Esses patógenos invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo, com consequência negativa na produção de açúcar e etanol (Gallo *et al.* 2002, Mendonça *et al.* 1996).

O controle de *D. flavipennella* é dificultado uma vez que, a fase larval permanece a maior parte do seu desenvolvimento no interior do colmo. Segundo Mendonça *et al.* (1996), há um complexo de parasitóides, predadores e agentes entomopatógenos que ocorrem naturalmente no agroecossistema da cana-de-açúcar controlando as diversas espécies de *Diatraea* na América Latina.

As liberações inundativas do endoparasitóide larval, *Cotesia flavipes* (Cam.) para o controle de *Diatraea* spp. é a forma mais utilizada no Brasil desde de 1974 quando este braconídeo, proveniente de Trinidad Tobago, foi introduzido no Estado de Alagoas consolidando, assim, o sucesso do controle biológico destas brocas (Parra *et al.* 2002, Pinto 2006). Embora, o emprego deste parasitóide seja um eficiente agente de controle, este não tem sido efetivo para o controle de *D. flavipennella*, sendo os fungos entomopatogênicos uma alternativa para incrementar o controle desta praga. De acordo com Alves *et al.* (2008), a broca *D. saccharalis* é suscetível aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, os quais ocorrem naturalmente infectando cerca de 10% das larvas, nas condições do Nordeste do Brasil. Estudos com isolados destes

fungos demonstram patogenicidade a ovos e larvas de diversos artrópodes (Ekesi *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2005, Silva *et al.* 2003, Zappelini *et al.* 2010).

Dessa forma, o estudo de isolados dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* para utilização no controle de *D. flavipennella* em cana-de-açúcar contribuirá para o desenvolvimento de uma alternativa para incrementar o Manejo Integrado desta praga na região canavieira nordestina.

Material e Métodos

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

Criação de *Diatraea flavipennella*. Os insetos utilizados nos bioensaios foram provenientes de criação estabelecida em laboratório ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR de 70%), a partir de coletas sucessivas de lagartas de *D. flavipennella* nos canaviais da Usina Central Olho D'água localizada no Município de Camutanga - PE. A criação das lagartas foi efetuada sob dieta artificial de Hensley & Hammond (1968), modificada por Araújo *et al.* (1985), a qual é constituída de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, sais de Wesson, ácido ascórbico, solução vitamínica, água e anticontaminantes. Ao formarem pupas, as mesmas foram transferidas para câmara úmida até a emergência dos adultos. Os adultos foram confinados em gaiolas de PVC, medindo 20x22cm (diâmetro e altura) revestido internamente com papel sulfite servindo de substrato para as posturas. Ainda, no interior da gaiola foi oferecido solução de mel (5%) e água. Os ovos coletados foram esterilizados com formol (3%) e sulfato de cobre (1%), colocados para secar e em seguida armazenados em câmara úmida até seu escurecimento e posterior eclosão quando então, realizou-se a distribuição das lagartas neonatas para tubos de fundo chato contendo dieta de alimentação. Após trinta dias, as lagartas foram transferidas para caixas plásticas contendo

dieta de realimentação, onde foram revisadas, periodicamente, para retirada de pupas. Estas, quando formadas, foram selecionadas e acondicionadas em câmara úmida para a emergência dos adultos.

Obtenção dos Isolados. Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* utilizados no estudo foram obtidos de diferentes hospedeiros e localidades (Tabela 1). Estes são provenientes da Micoteca do Laboratório de Patologia de Insetos (UFRPE) onde são conservados a $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ em tubos com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar mais o antibiótico sulfato de streptomina (BDA+A) e óleo Nujol[®] esterilizado. Utilizou-se 10 isolados de fungos sendo cinco de *M. anisopliae* e cinco de *B. bassiana* os quais foram revigorados em lagartas de *D. saccharalis* para posterior utilização nos bioensaios.

Preparo das Suspensões. Foram preparadas suspensões fúngicas mediante adição de 10 mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween[®] 80 a 0,01% (ADE + E), em placas contendo meio de cultura e o fungo, as quais foram aferidas mediante quantificação em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico, sendo posteriormente ajustada a concentração 10^7 conídios mL^{-1} . A viabilidade dos conídios foi determinada através da contagem dos conídios germinados e não germinados, em microscópio óptico de luz, 24 horas após o plaqueamento de 0,1mL da suspensão em BDA + A, como descrito por Alves & Moraes (1998).

Patogenicidade sobre Ovos de *D. flavipennella*. Para os testes de patogenicidade utilizaram-se suspensões dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, na concentração 10^7 conídios/mL, sobre ovos de 24, 48 e 72 horas de idade. Os experimentos constaram de quatro repetições, sendo cada uma composta por duas posturas contendo aproximadamente 30 ovos. As pulverizações das suspensões sobre os ovos foram feitas com auxílio de um microatomizador Paasche, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado para 5 libras de pressão. A testemunha foi pulverizada com água destilada e esterilizada mais espalhante adesivo Tween[®] 80 a 0,01% (ADE + E). Após

as pulverizações, os ovos de diferentes idades foram individualizados em caixas de acrílico forradas com papel filtro umedecido e mantidas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase. Foram efetuadas avaliações diárias, com auxílio de um microscópio estereoscópio, para observação e registro da infecção dos ovos e eclosão de lagartas. As lagartas recém-eclodidas foram transferidas para caixa de acrílico contendo um pedaço de cana, o qual foi trocado diariamente, por ocasião das avaliações. Os ovos e lagartas infectadas foram transferidos, individualmente, para câmara úmida e mantidas à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e fotofase de 12h, para confirmação do agente causal.

Determinação da Concentração Letal (CL_{50}) para Ovos de *D. flavipennella*. As suspensões utilizadas para determinação da CL_{50} sobre ovos foram ajustadas para as concentrações de 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 conídios mL^{-1} . A metodologia quanto à forma de aplicação, acomodação dos ovos e avaliação foi a mesma adotada no teste de patogenicidade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constando dos tratamentos correspondentes às diferentes concentrações das suspensões do patógeno, com seis repetições, sendo cada repetição composta por massas de ovos contendo entre 8 a 18 ovos com 72 horas de idade.

Patogenicidade sobre Lagartas de *D. flavipennella*. Lagartas no 2º instar foram pulverizadas com 1mL da suspensão fúngica na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} para cada tratamento, utilizando um microatomizador marca Paasche “VL”. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada uma composta por sete lagartas. Estas foram acondicionadas em recipientes plásticos contendo um pedaço de colmo de cana-de-açúcar de aproximadamente dois centímetros, trocado diariamente por ocasião das avaliações. Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase, sendo a mortalidade avaliada diariamente até o registro do último inseto morto,

os quais foram transferidos para câmara úmida e mantidos a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase para confirmação do agente causal.

Determinação das Concentrações Letais (CL_{50}) para Lagartas de *D. flavipennella*.

Suspensões do isolado selecionado foram ajustadas para as concentrações 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 e 10^7 conídios mL^{-1} e usadas para pulverizar as lagartas, compondo, assim, os tratamentos. O grupo controle foi pulverizado com água destilada e esterilizada mais espalhante adesivo Tween® 80 a 0,01% (ADE + E). Para cada tratamento utilizaram-se seis repetições com sete lagartas cada, totalizando 42 lagartas por tratamento, as quais foram pulverizadas com 1mL de cada concentração. No preparo e aplicação das suspensões, determinação da viabilidade de conídios, acomodação das lagartas e avaliações, foi utilizada a mesma metodologia aplicada no experimento de patogenicidade.

Análises Estatísticas. As médias relacionadas aos dados obtidos nos testes de patogenicidade, transformadas em arco-seno $\sqrt{(x + 0,5)}$ quando necessário, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A partir dos dados obtidos pela mortalidade confirmada das lagartas determinou-se a porcentagem de sobrevivência média, sendo os mesmos submetidos ao teste de Log-Rank, por pares de isolado, pelo método Kaplan-Meyer, usando o Proc Lifetest. Na determinação da CL_{50} os dados de mortalidade de lagartas e infecção de ovos, foram submetidos a análise de Probit. Para todas as análises utilizou-se o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados e Discussão

Patogenicidade de Isolados dos Fungos sobre Ovos de *D. flavipennella*. As viabilidades dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* testados sobre ovos de *D. flavipennella* foram superiores

a 96%. A maioria dos isolados testados foi patogênico à ovos de *D. flavipennella*, no entanto, somente dois isolados de *B. bassiana*, URPE-3 e ESALQ 447, foram capazes de ocasionar infecção superior a 50% e somente em ovos de 24 horas de idade.

Por outro lado, todos os isolados do fungo *M. anisopliae* testados foram patogênicos à ovos de *D. flavipennella*, proporcionando 100% de infecção aos ovos de 24 e 48 horas de idade, inibindo totalmente a eclosão das lagartas. Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida *et al* (1984) sobre ovos da broca *D. saccharalis* quando também registraram 100% de infecção para ovos de um e dois dias de idade. O mesmo efeito foi observado para ovos de *Blissus antillus* (Leonard) tratados com *M. anisopliae* na concentração de 5×10^6 conídios/mL ocasionando 100% de infecção (Samuels *et al* 2002).

Com relação aos ovos de 72 horas de idade, o isolado URPE-11 manteve a infecção de 100%, apresentada nos dois primeiros dias. Enquanto, para os demais isolados a porcentagem de infecção variou de 43,8 a 96,3%, (URPE-19 e E9). A porcentagem média de eclosão para estes ovos variou de 3,7 a 52,5% para os isolados testados, diferindo da testemunha com 87,5% de eclosão, tais dados corroboram com os resultados de infecção (Tabela 2).

De acordo com Pinto (2006), os ovos de *D. saccharalis* são mais suscetíveis ao fungo *M. anisopliae* até três a quatro dias de idade. Quando são inoculados com quatro dias de idade, houve dificuldade na colonização dos ovos pelo fungo, devido à eclosão das lagartas nos dias subsequentes à inoculação, não havendo tempo hábil para colonização, podendo haver infecção das lagartas eclodidas (Almeida *et al* 1984).

Das lagartas provenientes dos ovos tratados observou-se uma infecção de 44,4 a 98,1% (Tabela 2). Sendo, neste caso, os isolados E9, ESALQ 1189 e URPE-19 os mais eficientes sobre as lagartas recém-eclodidas, embora este último tenha se mostrado inferior na infecção dos ovos.

A mortalidade das lagartas neonatas é resultante da penetração do fungo no ovo e tegumento das mesmas antes da eclosão, ou como resultado da aquisição indireta do inóculo pela lagarta, ao se alimentar do córion contaminado (Ekesi *et al* 2002). Mochi *et al* (2010), estudando o efeito do isolado E9 de *M. anisopliae* a uma concentração de 10^7 conídios/mL sobre ovos e larvas de *Haematobia irritans* (L.) demonstraram que este não causou a infecção dos ovos, no entanto promoveu 37,7% de mortalidade das larvas eclodidas.

Diante do exposto pode-se observar que os ovos de 24 e 48 horas de idade foram mais suscetíveis aos fungos, no entanto os isolados de *M. anisopliae* provocaram infecção também em ovos de 72 horas de idade, enquanto *B. bassiana* foi eficiente apenas sobre ovos mais suscetíveis, com 24 horas de idade.

Nos ovos tratados com os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* observou-se a infecção gradual da postura onde, um ovo infectado acarretava na infecção completa de todos. Tal observação, foi também relatada por Ekesi *et al.* (2002) sobre massas de ovos de *Maruca vitrata* Fab. e *Clavigralla tomentosicollis* Stal. tratadas com os mesmos fungos.

Os ovos tratados com os isolados de *B. bassiana* apresentaram, inicialmente, coloração rósea característica do pigmento denominado oosporina, que possui atividade bactericida, que evita a proliferação de outros microorganismos no hospedeiro. Após 96 horas, os ovos adquiriram coloração branca em razão da intensa esporulação do fungo. O fungo *M. anisopliae* promoveu uma pigmentação escura na parede dos ovos tratados. Tal efeito não interferiu na eclosão de larvas provenientes de alguns ovos que apresentaram essa pigmentação. No final da conidiogênese, os ovos apresentaram uma camada pulverulenta de conídios característico da doença, a qual é conhecida como “muscardine verde”.

A suscetibilidade de ovos de insetos à agentes microbianos é pouco discutida na literatura, contudo, Mellini (1986) descreveu que a idade do ovo pode restringir a aceitação por

parasitóides, em função do endurecimento do córion, dificultando a penetração do ovipositor. Efeito semelhante pode ocorrer com a penetração do fungo no hospedeiro onde, a esclerotização do ovo propicia tanto uma barreira física, por endurecer consideravelmente o tegumento, quanto uma barreira química, por torná-lo mais estável diante da ação enzimática dos patógenos (Alves & Pereira 1998).

Diante da maior eficiência dos fungos sobre ovos nos primeiros dias de idade espera-se que a eficiência de controle no campo seja alcançada quando se observar maior densidade de ovos nos três primeiros dias de desenvolvimento embrionário. As maiores concentrações de ovos em campo são detectadas em cana-planta e em socaria, durante os quatros primeiros meses de idade (Mendonça *et al.* 1996). Dessa forma, o acompanhamento da fenologia da planta, da evolução da praga no campo, bem como da época do ano irá direcionar o controle efetivo da mesma considerando que, a fase de ovo representa o fator chave de crescimento populacional da praga.

Determinação da Concentração Letal (CL₅₀) para Ovos de *D. flavipennella*. Diante da elevada infecção ocasionada pelo isolado URPE-11 de *M. anisopliae*, nas diferentes idades dos ovos, o qual causou 100% de infecção, determinou-se a CL₅₀ estimada em $2,0 \times 10^5$ com limites inferior e superior de $1,5 \times 10^5$ e $2,8 \times 10^5$, respectivamente (Tabela 3).

Patogenicidade dos Isolados sobre Lagartas de *D. flavipennella*. Os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* testados apresentaram viabilidades superiores a 95%, demonstrando alta capacidade germinativa. Os fungos testados foram patogênicos as lagartas de 2º instar de *D. flavipennella*. Na mortalidade confirmada aos cinco dias de avaliação, somente o isolado URPE-4 de *B. bassiana* diferiu significativamente do isolado E9 de *M. anisopliae*, apresentando mortalidade de 40% e 74,2%, respectivamente (Tabela 4).

Resultado semelhante a estes foi observado por Wenzel *et al* (2006) que constataram uma mortalidade de 40,5% de lagartas de *D. saccharalis*, aos cinco dias de avaliação, pulverizadas

com suspensões do isolado IBCB 66 de *B. bassiana* na mesma concentração utilizada neste trabalho (10^7 conídios mL⁻¹).

Com relação à sobrevivência das lagartas tratadas, verificou-se diferença na sobrevivência média entre todos os isolados testados e a testemunha (Figs. 1 e 2). Contudo, dentro dos tratamentos houve diferença somente entre os isolados URPE-22 e ESALQ 447 de *B. bassiana*, com sobrevivência média de 11,29 e 5,76 dias e entre os isolados URPE-19 e ESALQ 1189 de *M. anisopliae*, com 6,47 e 3,23 dias, respectivamente. De maneira geral, os resultados de mortalidades confirmadas pelos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* evidenciam que todos os isolados testados apresentaram patogenicidade à broca *D. flavipennella*, pois a menor mortalidade foi de 40% referente ao isolado URPE-4 (Tabela 4).

A patogenicidade dos isolado ESALQ 447 de *B. bassiana* e E9 de *M. anisopliae* foi testada por Figueirêdo *et al* (2002) sobre a broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus*, na concentração de 10^8 conídios/mL, registrando 73,3% de mortalidade por *B. bassiana* e 43,3% por *M. anisopliae* após 15 dias de inoculação. Estes mesmos isolados quando testados por Silva *et al* (2003) na concentração de 10^7 conídios/mL sobre lagartas de *P. xylostella* proporcionaram mortalidades de 68% e 74%, respectivamente.

O isolado ESALQ 1189 de *M. anisopliae* na concentração 10^7 conídios/mL, César Filho *et al* (2002) registraram mortalidade de 60% para lagartas de *A. argillacea* valor semelhante ao obtido para *D. flavipennella*. Quando os isolados E9 e PL 43 de *M. anisopliae*, foram testados a uma concentração de 10^8 conídios/mL, os mesmos autores obtiveram 30% de mortalidade média para ambos os isolados.

Com base nos dados de sobrevivência, pode-se indicar que o fungo *M. anisopliae* foi mais virulento à broca *D. flavipennella*, quando comparado à *B. bassiana*, uma vez que, o melhor isolado de *M. anisopliae* testado proporcionou sobrevivência de 3,23 dias das lagartas após tratamento, enquanto que para o fungo *B. bassiana* foi de 5,76 dias.

Esses resultados são satisfatórios uma vez que o fungo *M. anisopliae* é produzido e utilizado em larga escala nos canaviais do Sudeste e Nordeste do país, para o controle das cigarrinhas da folha e raiz da cana-de-açúcar, podendo ser direcionado para utilização no Manejo Integrado das brocas *Diatraea* spp.

Determinação das Concentrações letais (CL₅₀) de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre lagartas de *D. flavipennella*. Com base nos valores de mortalidade confirmada e sobrevivência das lagartas tratadas com os fungos, os isolados ESALQ 447 de *B. bassiana* e ESALQ 1189 de *M. anisopliae* foram selecionados para a determinação da CL₅₀. A CL₅₀ do isolado ESALQ 447 de *B. bassiana* foi estimada em $1,2 \times 10^7$ conídios/mL com limites inferior e superior de $7,4 \times 10^6$ e $2,6 \times 10^7$, respectivamente. Em relação ao isolado ESALQ 1189 de *M. anisopliae* a CL₅₀ foi estimada em $1,2 \times 10^7$ conídios/mL com limites inferior e superior de $4,4 \times 10^6$ e $8,3 \times 10^7$, respectivamente (Tabela 5). As informações acerca da Concentração Letal (CL₅₀) para fungos entomopatogênicos são importantes uma vez que, serve como base para utilização de concentrações economicamente viáveis no controle da praga a nível de campo.

Conforme referido anteriormente, a utilização de *C. flavipes* para o controle de *D. flavipennella*, parece não ser suficiente, demonstrando a necessidade da inclusão de outras formas de controle. Assim sendo, os resultados obtidos nessa pesquisa sugerem a utilização de *M. anisopliae* e *B. bassiana* no Manejo Integrado dessa broca, na região canavieira do Nordeste.

Literatura Citada

- Almeida, L.C., S.B. Alves, P.S.M. Botelho, N. Degaspari, J.B. Pinheiro. 1984.** Determinação da patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., sobre ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) de diferentes idades. Bras. Açucar. 102: 20-27.
- Alves, S.B., R.B. Lopes, S.A. Vieira & M.A. Tamai. 2008.** Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina, p.69-110. In S.B. Alves & R.B. Lopes, Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba, FEALQ, 414 p.
- Alves, S.B. & S.A. Moraes. 1998.** Quantificação de inóculo de patógenos de insetos, p. 765-777. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. & R.M. Pereira. 1998.** Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatogênicos, p. 39- 54. In S.B. Alves & R.B. Lopes, Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba, FEALQ, 414 p.
- Araújo, J.R., P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Saccharum APC, Rev. Tecnol. Indúst. Açuc. Alcool. 36: 45-48.
- Castro, P.R.C & P.J. Christoffoletti. 2005.** Fisiologia da cana de açúcar, p.3-48. In Mendonça, A.F. (ed.), Cigarrinhas da cana-de-açúcar: Controle Biológico. Maceió, Insecta, 317p.
- César Filho, E., E.J. Marques & R. Barros. 2002.** Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) caterpillars. Scientia Agric. 59: 457-462.
- Cesnik, R. & J. Miocque. 2004.** Histórico, p. 23-30. In R. Cesnik & J. Miocque (eds.), Melhoramento da cana-de-açúcar. Brasília, EMBRAPA. 307p.

- Ekesi, S., R.S. Adamu & N.K. Maniania. 2002.** Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes to the legume pod borer, *Maruca vitrata* and the pod sucking bug, *Clavigralla tomentosicollis*. *Crop Prot.* 21:589-595.
- Ferreira, J.F., E.J. Marques, I.M.R. Marques, J.V. Oliveira & H.J.G. Santos Júnior. 2005.** Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos de *Alabama argillacea* (Huebner.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Magistra* 17: 119-123.
- Figueirêdo, M.F.S., E.J. Marques, R.O.R. Lima & J.V. Oliveira. 2002.** 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). *Neotrop. Entomol.* 31: 397- 403.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond Jr. 1968.** Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743.
- Lucchesi, A.A. 2001.** Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), p. 13-45. In: P.R.C. Castro, R.A, Kluge (eds.), *Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira*. Cosmópolis, Stoller do Brasil, 138p.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2010.** Cana-de-açúcar. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em 11/12/2010.
- Marques, E.J., R.O.R. Lima & J.V. Oliveira. 2009.** *Pragas da cana-de-açúcar: nordeste do Brasil*. Recife, EDUFRPE, 54p.

- Mellini, E. 1986.** Importanza dell'età dell'uovo, al momento della parassitizzazione, per la biologia degli imenotteri oofagi. Bolletino dell'Intituto di Entomologia Guido Grandi della Università de Bologna. Bologna, 41: 1- 21.
- Mendonça, A.F., J.A. Moreno, S.H. Risco & I.C.B. Rocha. 1996.** As brocas da cana-de-açúcar, *Diatraea* spp. (Lep., Pyralidae), p. 51-82. In A.F. Mendonça (Ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 200p.
- Mochi, D.A., A.C. Monteiro, A.C.R. Machado & L. Yoshida. 2010.** Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). Vet. Parasit. 167: 62–66.
- Oliveira, M. A. P., E.J. Marques, V. Wanderley-Teixeira & R. Barros. 2008.** Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). Acta Sci. Biol. 30: 220-224.
- Parra, J.R.P., P. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J. Bento. 2002.** Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo, Manole, 586p.
- Pinto, A.S. 2006.** Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho, Biocontrol, 64p.
- Samuels, R.I., D.L.A. Coracini, C.A.M. Santos & C.A.T. Gava. 2002.** Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) Eggs by the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Biol. Control 23: 269-273.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Silva, V.C.A., R. Barros, E.J. Marques & J.B. Torres. 2003.** Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos Fungos *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Neotrop. Entomol. 32: 653-658.

Wenzel1, I.M., F.H.C. Giometti & J.E.M. Almeida. 2006. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. Arq. Inst. Biol. 73: 259-261.

Zappelini, L.O., J.E.M. Almeida, A. Batista Filho & F.H.C. Giometti. 2010. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). Arq. Inst. Biol. 77: 75-82.

Tabela 1. Hospedeiros e Origem dos isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* utilizados nos experimentos com *Diatraea flavipennella*.

Fungos	Isolados	Hospedeiro	Origem
<i>M. anisopliae</i>	E 9	<i>Deois flavopicta</i>	Vitória-ES
	PL43	<i>M. posticata</i>	Flexeiras-AL
	URPE-19	Solo	Vitória - PE
	URPE- 11	<i>M. posticata</i>	Recife-PE
	ESALQ1189	Solo	Piracicaba - SP
<i>B. bassiana</i>	URPE -3	<i>Rhyncophorum palmarum</i>	Cabo – PE
	URPE - 4	<i>Membracis sp.</i>	Recife – PE
	URPE - 18	Solo	Cabo - PE
	ESALQ 447	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá - MS
	URPE- 22	Percevejo	Bagisa – BA

Tabela 2. Porcentagens de infecção de ovos, de 72 horas, eclosão e infecção de lagartas de *Diatraea flavipennella* tratado com isolados de *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^7 conídios/mL. Temp.: $27 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R: $70 \pm 10\%$, Fotofase: 12h

Isolados	Infecção de ovos (%)	Eclosão de lagartas (%)	Infecção de lagartas ¹ (%)
PL43	$92,4 \pm 7,57\text{a}^2$	$7,6 \pm 7,6\text{c}^2$	$44,4 \pm 0,00\text{b}^2$
E9	$96,3 \pm 2,04\text{a}$	$3,7 \pm 2,04\text{c}$	$98,1 \pm 1,88\text{a}$
ESALQ 1189	$88,9 \pm 6,53\text{a}$	$11,3 \pm 6,53\text{bc}$	$88,9 \pm 11,11\text{a}$
URPE-11	$100 \pm 0,00\text{a}$	-	-
URPE-19	$43,8 \pm 17,51\text{b}$	$52,5 \pm 15,98\text{ab}$	$68,6 \pm 4,49\text{ab}$
Testemunha	-	$87,5 \pm 4,6\text{a}$	-
Estatísticas	$F_{4; 19} = 7,16^{0,0020}$	$F_{4; 19} = 14,32^{0,0001}$	$F_{3; 15} = 9,16^{0,0020}$

¹ Porcentagem de infecção de lagartas provenientes de ovos tratados pelo fungo.

² Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Estimativa da CL_{50} do isolado URPE-11 de *Metarhizium anisopliae* para ovos de 72 horas de *Diatraea flavipennella*. Temp.: $27 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R: $70 \pm 10\%$, Fotofase: 12h

Isolados	$\chi^2^{(1)}$	$\beta \pm EP^{(2)}$	P	CL_{50} (Conídios mL^{-1}) (95% IC) ⁽³⁾
URPE-11	6,05	$1,32 \pm 0,14$	0,1094	$2,0 \times 10^5$ ($1,5 \times 10^5 - 2,8 \times 10^5$)

¹ χ^2 = Teste de qui-quadrado.

²($\beta \pm EP$)= Coeficiente angular da reta \pm erro padrão.

³(95% IC)= Intervalo de confiança, 5% significância.

Tabela 4. Mortalidade confirmada (%) aos cinco dias de avaliação e sobrevivência de lagartas de *Diatraea flavipennella* tratadas com isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (10^7 conídios mL⁻¹). Temp.: 27±2°C, UR 70±10%, fotofase: 12 h

Isolados	Mortalidade (%) 5 dias ¹	Sobrevivência (dias) ²
<i>B. bassiana</i>	URPE-3	52,7 ± 7,04ab
	URPE-4	40,0 ± 5,16b
	URPE-18	46,4 ± 7,26ab
	URPE-22	48,3 ± 8,64ab
	ESALQ 447	70,8 ± 9,08ab
	Testemunha	-
		$\chi^2 = 26,24 < 0,0001$
<i>M. anisopliae</i>	PL 43	54,8 ± 6,82ab
	E9	74,2 ± 6,97a
	ESALQ 1189	61,2 ± 6,29ab
	URPE-11	59,5 ± 6,82ab
	URPE-19	56,4 ± 4,83ab
	Testemunha	-
$F_{9, 59} = 2,28^{0,0312}$		$\chi^2 = 93,83 < 0,0001$

¹ Médias (±EP) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey;

² Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Log-Rank por pares de isolados após análise de sobrevivência pelo método Kaplan-Meyer.

Tabela 5. Estimativa da CL_{50} dos isolados ESALQ 447 de *Beauveria bassiana* e ESALQ 1189 de *Metarhizium anisopliae* para lagartas de *Diatraea flavipennella*. Temp.: $27 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R: $70 \pm 10\%$, fotofase: 12h

Isolados	$\chi^2^{(1)}$	$\beta \pm EP^{(2)}$	P	CL_{50} (Conídios mL^{-1}) (95% IC) ⁽³⁾
ESALQ 447	0,47	$1,34 \pm 0,24a$	0,9244	$1,2 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^6 - 2,6 \times 10^7$)
ESALQ 1189	5,47	$0,48 \pm 0,09b$	0,3614	$1,2 \times 10^7$ ($4,4 \times 10^6 - 8,3 \times 10^7$)

¹ χ^2 = Teste de qui-quadrado.

²($\beta \pm EP$)= Coeficiente angular da reta \pm erro padrão.

³(95% IC)= Intervalo de confiança, 5% significância.

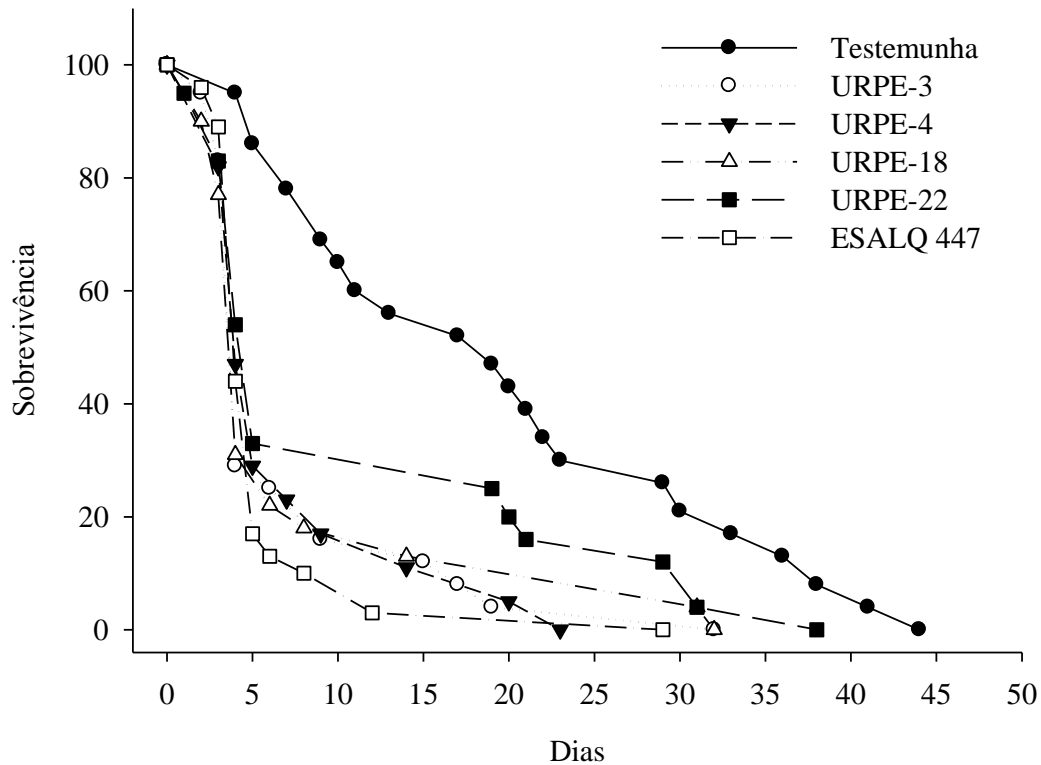


Figura 1. Sobrevivência de *Diatraea flavipennella* tratada com isolados de *Beauveria bassiana* na concentração 10^7 conídios mL⁻¹. Temp.: 27±2°C, UR 70±10%, Fotofase: 12h.

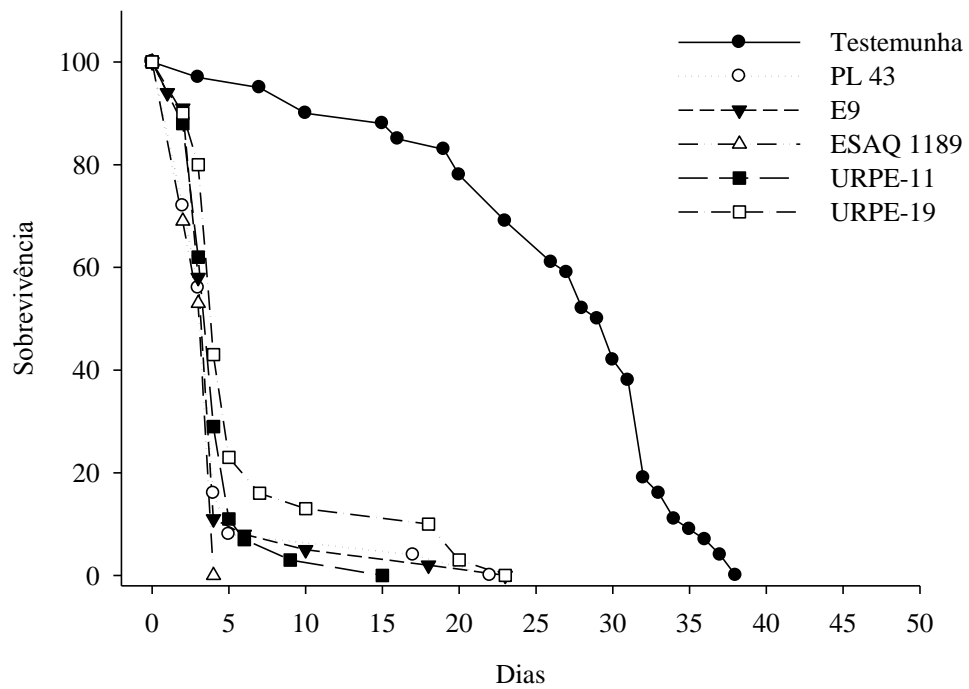


Figura 2. Sobrevivência de lagartas de *Diatraea flavipennella* tratada com isolados de *Metarhizium anisopliae* na concentração 10^7 conídios mL⁻¹. Temp.: 27±2°C, UR 70±10%, Fotofase: 12h.