

EFEITO DE SUCESSIVAS REPICAGENS EM ARROZ NA VIRULÊNCIA DE METARRHIZIUM ANISOPLIAE PARA DEOIS FLAVOPICTA¹

FLÁVIA RABELO BARBOSA, WELLINGTON ANTONIO MOREIRA² e GIL SANTOS³

RESUMO - Foi verificado, através de bioensaios com ninfas de *Deois flavopicta* Stal 1854 (Homoptera, Cercopidae), o efeito de sucessivas repicagens em meio de arroz, na virulência de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Testaram-se a cepa E₉, proveniente do Estado do Espírito Santo, e o isolado J-71, obtido de infecção natural em *D. flavopicta*, em Jataí, GO. Em ambos casos, partiu-se de esporos retirados de cigarrinhas infectadas em laboratório, para obtenção da primeira geração em meio de arroz. Os resultados indicaram que o ponto máximo de virulência é atingido na terceira geração do fungo. Nesta geração, a percentagem de infecção das ninfas foi de 65% para a cepa E₉, e 76,6% para o isolado J-71. A partir da terceira geração, houve sensível redução na infecção das ninfas; na décima geração, a percentagem de infecção foi de 11,3% para E₉, e 16,7 para J-71. Dois dias após a inoculação do fungo, teve início a morte dos insetos. O crescimento micelial externo iniciou-se após três a quatro dias, e a esporulação, após cinco a sete dias.

Termos para indexação: *Metarrhizium anisopliae*, *Deois flavopicta*, controle microbiológico, cigarrinha-das-pastagens.

EFFECT OF SUCCESSIVE TRANSPLANTATION IN RICE ON THE VIRULENCE OF METARRHIZIUM ANISOPLIAE (METSCH.) SOROKIN AGAINST DEOIS FLAVOPICTA

ABSTRACT - The effect of successive transplantation in a rice medium on the virulence of *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin was studied through a bioassay with nymphs of *Deois flavopicta* Stal 1854 (Homoptera, Cercopidae). The strain E₉, from Espírito Santo state, Brazil, and an isolate J-71, obtained from a natural infection in *Deois flavopicta*, in Jataí, GO, Brazil, were tested. In both cases spores were collected from artificially infected spittlebugs to obtain the first generation in rice medium. It was demonstrated that the maximum degree of virulence was attained in the third generation of fungus. In this generation, the percentage of dead nymphs, due to *Metarrhizium anisopliae*, ranged from 65% for strain E₉ to 76.6% for the J-71 isolate. After three generations in a rice medium, rapid reduction was observed in the nymphal infection rate. After 10 generations, the average percent infection was 11.3 for strain E₉ and 16.7 for J-71. Insects started to die two days after the fungal inoculations; superficial mycelial growth began after three to four days, and sporulation started from five to seven days after inoculation.

Index terms: *Metarrhizium anisopliae*, *Deois flavopicta*, microbial control, grass spittlebug.

INTRODUÇÃO

O fungo entomógeno, *Metarrhizium anisopliae*, tem sido bastante utilizado no Brasil, nos últimos anos, na luta contra pragas, especialmente cigarrinhas-da-cana-de-açúcar (Guagliumi et al. 1974, Aquino et al. 1975, Pereira et al. 1979) e cigarrinhas-das-pastagens (Araújo & D'Aguiar 1975, Correia et al. 1979, Ramiro & Cottas 1979, Oli-

veira & Curi 1979, Silva 1980).

Geralmente, utiliza-se o arroz cozido como meio de cultura para produção de *M. anisopliae* em larga escala, sendo freqüente a sua multiplicação por empresas particulares e estatais, principalmente nos Estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, São Paulo e Mato Grosso. Quando comparado com outros substratos de diferentes origens e características, o arroz apresenta vantagens, como ótima produção de esporos, baixo custo e fácil manuseio (Aquino 1974, Balaraman 1980, Marques et al. 1981, Daoust & Roberts 1983).

De maneira geral, os fungos entomógenos podem ser cultivados em meio artificial sem muita dificuldade (Ferron 1981); contudo, após sucessivos cultivos, a virulência poderá ser reduzida ou

¹ Aceito para publicação em 14 de janeiro de 1985.

² Eng. - Agr., M.Sc., EMGOPA/Estação Experimental "Olavo Sérvulo de Lima", Rua Joaquim Cândido, 297, CEP 76300, Jataí - GO.

³ Eng. - Agr., M.Sc., EMGOPA/Estação Experimental de Goiânia, Caixa Postal 49, CEP 74000 Goiânia, GO.

até mesmo perdida, conforme foi observado no caso da *Beauveria bassiana* (Schaerffenberg 1964) e *M. anisopliae* (Fox & Jaques 1958, Latch 1965).

O objetivo deste trabalho foi determinar a geração na qual ocorre a máxima virulência de *M. anisopliae*, para a cigarrinha-das-pastagens, *Deois flavopicta*, utilizando-se arroz, como substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Para se observar o efeito de sucessivas repicagens em arroz, na virulência de *M. anisopliae*, realizaram-se bioensaios com ninfas de *D. flavopicta*, testando-se a cepa E₉, proveniente da Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA), e um isolado obtido de infecção natural, em *D. flavopicta* (J-71), no município de Jataí, GO.

Iniciaram-se os bioensaios com ninfas que foram infectadas em laboratório com as cepas E₉ e J-71. Para a obtenção da primeira geração do fungo em meio de cultura, foram retirados esporos das cigarrinhas e inoculados em meio de arroz, preparado com 20 g de arroz e 50% de água. Quando a cultura estava com sete dias de idade, procedeu-se à transferência de grãos de arroz que continham esporos do fungo, para Erlenmayer contendo meio de arroz, obtendo-se, assim, a segunda geração e, a partir desta, as gerações subsequentes, seguindo-se a mesma metodologia. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com arranjo fatorial 2 x 10 e seis repetições, sendo o primeiro fator as cepas e, o segundo, as gerações do fungo. Na comparação das médias, foi empregado o teste de Duncan.

Coletaram-se ninfas do terceiro ínstar em *Brachiaria decumbens*, no campo da Estação Experimental "Olavo Sérvulo de Lima", em Jataí, GO, que foram transferidas para plantas de *B. decumbens* cultivadas em vasos de plástico com capacidade para 500 ml. Após 24 horas, quando as ninfas já estavam fixadas e produzindo espuma, procedeu-se às inoculações com uma gota de suspensão que continha aproximadamente $8,8 \times 10^8$ conídios/ml de *M. anisopliae* e 1% de Hiten, com viabilidade variando de 97% - 98% para J-71 e 98% - 99% para E₉. A contagem dos conídios foi feita em hemacitômetro, e o teste de viabilidade foi executado em BDA, após 22 horas de incubação dos conídios a 25°C. As testemunhas receberam inoculação de uma gota de água destilada esterilizada. Após a inoculação, as ninfas permaneceram à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$).

Por um período de dez dias após a inoculação, realizaram-se observações diárias. Após a morte, as cigarrinhas foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 0,5%, enxaguadas por três vezes em água destilada esterilizada, e colocadas, individualmente, em placas-de-petri contendo papel-filtro umedecido. Em microscópio estereoscópico, verificou-se o início do crescimento micelial externo e da

esporulação do fungo. Os insetos que não apresentaram nenhum desenvolvimento do fungo, após dez dias da inoculação, não foram considerados infectados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ponto máximo de virulência de *M. anisopliae*, para *D. flavopicta*, foi atingido na terceira geração do fungo, em meio de arroz. Nesta geração, a percentagem de infecção de ninfas foi de 65%, para E₉, e 76,6% para J-71. A partir da terceira geração, houve uma redução gradativa na infecção das cigarrinhas, chegando a uma percentagem média de infecção de 11,3%, para E₉, e 16,7% para J-71, na décima geração (Fig. 1). A morte dos insetos teve início dois dias após a inoculação; o crescimento micelial externo iniciou-se após três a quatro dias, e a esporulação, após cinco a sete dias. A percentagem de infecção nas testemunhas foi nula.

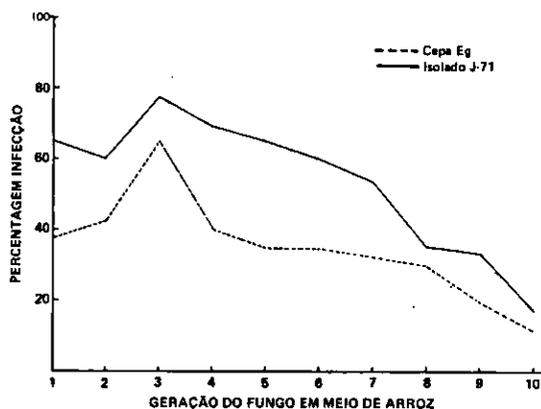


FIG. 1. Infecção (%) de *Deois flavopicta* inoculada com *Metarrhizium anisopliae*, nas diferentes gerações em meio de arroz.

A análise de variância mostrou efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, para cepas, gerações e interação cepas x gerações. Considerando que a interação cepas x gerações foi altamente significativa, fez-se a comparação de médias entre gerações dentro de cepas e de cepas dentro de gerações. Tanto para a cepa J-71 como para E₉, a maior percentagem de infecção foi obti-

da na terceira geração (77% e 65%, respectivamente). Não houve diferenças entre as gerações 1, 4 e 5, para a cepa J-71, nem entre as gerações 1, 2 e 4, para a cepa E₉ (Tabela 1).

O efeito de sucessivas repicagens em meio arti-

ficial, na virulência de *B. bassiana*, foi estudado por Schaerffenberg (1964). Observou-se que a maior virulência foi obtida na terceira geração em meio de cultura e mantida no mesmo nível até a 16^a, notando-se, a partir daí, um sensível declínio.

TABELA 1. Médias de infecção (%) relativas a interação cepas x gerações sucessivas de *Metarrhizium anisopliae* cultivado em meio de arroz, comparadas entre e dentro pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. EMGOPA, Jataí, GO, 1982.

Isolado/Cepa	Geração do fungo em arroz ^a										Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
J-71	65 aBC	60 aCD	77 aA	68 aB	65 aBC	60 aCD	53 aD	35 aE	33 aE	17 aF	53
E ₉	37 bBCD	42 bB	65 bA	40 bBC	35 bCD	35 bCD	32 bD	30 aD	20 bE	11 aF	35
Média	51	52	71	54	50	47	42	32	27	14	-

^a Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, na horizontal, e letras minúsculas, na vertical, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos indicam que a multiplicação de *M. anisopliae*, para ser usada como agente de controle biológico de *D. flavopicta*, no campo, deve ser feita a partir da segunda geração em meio de arroz; assim, o fungo distribuído no campo estará com seu potencial máximo de virulência.

2. Após a terceira geração em meio de arroz, o fungo deverá ser reisolado do inseto, para que seja novamente multiplicado em laboratório.

3. O fato de a virulência do isolado nativo (J-71) ser superior à da cepa introduzida (E₉) salienta a importância da utilização de fungo já adaptado às condições ambientais da região e à espécie de cigarrinha que se pretende controlar.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, M.L.N. de. O fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. Recife, Inst. Pesq. Agron., 1974. 25p. (Boletim Técnico, 72).
- AQUINO, M.L.N. de.; CAVALCANTE, V.A.L.B.; SENA, R.C. de & QUEIROZ, G.F. de. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarrhizium anisopliae*. Recife, CODECAP, 1975. 31p. (Boletim Técnico, 4).
- ARAÚJO, D.O.B. & D'AGUIAR, Z.M.F. Controle bioló-

gico das cigarrinhas-das-pastagens. B. Inst. Biol. Bahia, 14(1):1-5, 1975.

- BALARAMAN, K. Mass production and storage of microbial agents for use in mosquito control. Indian J. Med. Res., 72:222-6, 1980.
- CORREIA, J.S.; FERRAZ, M.C.V.D.; COSTA, J.A. & MATTA, E.A.F. Emprego do *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok., associado ao malathion 50 E no controle da cigarrinha-das-pastagens. Salvador, EPABA, 1979. 6p. (Comunicado Técnico, 22).
- DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarrhizium anisopliae* conidia; effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol., 41:161-70, 1983.
- FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarrhizium*. In: BURGESS, H.D., ed. Microbial control of pests and plant diseases. London, Academic Press, 1981. p.465-82.
- FOX, C.J.S. & JAQUES, R.P. Note on the green-muscardine fungus, *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., as a control for wireworms. Can. Entomol., 90: 314-5, 1958.
- GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J. & VILAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarrinha-da-folha *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. Recife, CODECAP, 1974. 54p. (Boletim Técnico, 3).
- LATCH, G.C.M. *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture-inhabiting insects. N.Z.J. Agric.

- Res., 8:384-96, 1965.
- MARQUES, E.J.; VILAS BOAS, A.M. & PEREIRA, C.E.F. Orientações técnicas para produção do fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) em laboratórios setoriais. Piracicaba, PLANALSUCAR, 1981. 23p. (Boletim Técnico, 3).
- OLIVEIRA, M.A.S. & CURI, W.J. Dinâmica da população e controle biológico da cigarrinha em pastagens de *Brachiaria decumbens* em Rondônia. Porto Velho, EMBRAPA-UEPAE Porto Velho, 1979. 13p. (Comunicado Técnico, 7).
- PEREIRA, C.E.F.; MARQUES, E.J.; LIMA, R.O.R. de & VILAS BOAS, A.M. Principais pragas da cana-de-açúcar no Nordeste. Piracicaba, PLANALSUCAR, 1979. 67p. (Boletim Técnico, 1).
- RAMIRO, Z.A. & COTTAS, M.P. Ensaio de campo com diferentes dosagens de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin 1983, visando o controle de *Deois flavopicta* (Stal 1824) e *Zulia enteriana* (Berg 1979) em pastagens. *O Biológico*, 45(11/12):199-204, 1979.
- SCHAERFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for the development of mucoses caused by *Beauveria* and *Metarrhizium*. *J. Insect Pathol.*, 6:8-20, 1964.
- SILVA, A.L. Ensaio de controle biológico da cigarrinha-das-pastagens *Deois flavopicta* pelo fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae*. Goiânia, EMGOPA, 1981. p.108-12 (Relatório Técnico, 1980).