ESTUDO DE ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)
SOROKIN, 1883 PARA CONTROLE DE
CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS

VALDIVINO ENEDINO BORGES
Engenheiro Agrônomo

Orientador : Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas - Área de Concentração :
Entomologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1985

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha esposa Milma,

ã minha filha Larissa,

ao meu filho Danilo,

ã memória de meu filho

Marquinho e de meus pais,

Enedino e Albina e,

aos meus irmãos, Jacinto,

Antonio e Joaquim.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa os seus agradecimentos a "Deus" por ter lhe dado força nas horas difíceis e as seguintes pessoas e instituições:

- . Ao Dr. Sérgio Batista Alves, Professor do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pela orientação, dedicação e estímulo na execução e preparo deste trabalho.
- . À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso (EMPA - MT) e Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.
- . Aos amigos da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso (EMPA-MT), pelo constante apoio recebido.
- . Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos.
- . Aos Drs. José Djair Vendramim e Evoneo Berti Filho, do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP; Aquiles Sandanielo, Sebastião Carneiro e Maria das Dores, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso pelas sugestões concedidas.

- . Aos Técnicos Agrícolas Claudemiro Nascimento e Valdézio Lopes pela dedicação nos trabalhos de campo.
- . Aos Funcionários da Biblioteca Central da ESALQ/USP e da EMPA-MT, em especial à Srª Eunice Oda, pela presteza de atendimento.
- . Aos Drs. Sinval Silveira Neto e Octávio Nakano, Professores Titulares e Chefe do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pela atenção que nos dispensou.
- . À Drª Tamara June Lister, Professora do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Mato Grosso (FUFMT); pela versão do resumo para o inglês.
- . À Agropecuária Guarita S/A pela concessão da área experimental.
- . Ao Dr. Jurandy Pinto, pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso (EMPA-MT), pelos trabalhos gráficos.
- . À Srª Maria Selma Machado e Paulo José Costa, pelos serviços datilográficos.

- . Aos meus amigos de todos os momentos vividos neste Departamento, especialmente: Henrique, Irineu, José Negreiros, João Weine, Marcão, Mauri e Valério.
- . A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
SUMMARY.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Classificação e descrição.....	4
2.2. Emprego do <i>M. anisopliae</i> no controle micro- biano.....	7
2.3. Caracterização de isolados de <i>M. anisopliae</i>	11
2.4. Sensibilidade do <i>M. anisopliae</i> a radiação ultravioleta.....	14
2.5. Produção de conídios.....	16
2.6. Dinâmica populacional das cigarrinhas.....	17
2.6.1. Amostragens e freqüência das espê- cies.....	17
2.6.2. Flutuação populacional.....	19
3. METODOLOGIA.....	21
3.1. Material.....	22
3.1.1. Equipamentos.....	22
3.1.2. Isolados do fungo <i>M. anisopliae</i>	24
3.1.3. Meios de cultura.....	26

3.1.4. Insetos utilizados no bioensaio.....	27
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Flutuação populacional das cigarrinhas.....	28
3.2.2. Determinação da ocorrência natural do fungo <i>M. anisopliae</i> sobre cigarrinhas.....	29
3.2.3. Produção de conídios e características culturais de 13 isolados de <i>M. anisopliae</i> em meio de BDA.....	30
3.2.4. Medição dos conídios dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	31
3.2.5. Efeito da radiação ultravioleta sobre os diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	31
3.2.6. Bioensaio com <i>D. saccharalis</i>	32
3.2.7. Determinação da capacidade de produção de enzimas dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	33
3.2.8. Utilização do fungo <i>M. anisopliae</i> em diferentes doses para controle de cigarrinhas.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Flutuação populacional de cigarrinhas.....	37
4.2. Ocorrência natural do fungo <i>M. anisopliae</i> em cigarrinhas.....	41

4.3. Crescimento das colônias e produção de conídios dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	44
4.4. Características morfológicas das colônias de 13 isolados de <i>M. anisopliae</i>	47
4.5. Dimensão dos conídios dos 13 isolados de <i>M. anisopliae</i>	48
4.6. Efeito da radiação ultravioleta sobre os diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	50
4.7. Bioensaio com <i>D. saccharalis</i>	68
4.8. Produção de enzimas.....	70
4.9. Utilização do fungo <i>M. anisopliae</i> em diferentes doses para controle de cigarrinhas.....	73
4.9.1. Mortalidade de ninfas.....	78
5. CONCLUSÕES.....	80
6. LITERATURA CITADA.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Relação dos isolados de <i>M. anisopliae</i> , respectivas procedências, hospedeiros originais e dados de coleta.....	25
2	Número de exemplares adultos de cigarrinhas das espécies <i>D. flavopicta</i> e <i>Z. entreriana</i> , coletadas no período de dezembro de 1983 a abril de 1985, na região de Rondonópolis - MT	39
3	Total de formas biológicas e mortalidade natural de adultos e ninfas de <i>D. flavopicta</i> e <i>Zulia entreriana</i> pelo fungo <i>M. anisopliae</i> amostradas com quadro de madeira, durante o período de dezembro de 1983 a abril de 1985	42
4	Diâmetro médio das colônias (mm) dos 13 isolados de <i>M. anisopliae</i> , após 6 dias de desenvolvimento em BDA a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas com os respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade.....	45

TABELA

Página

5	Valores médios do número de conídios $\times 10^7$, isolados de <i>M. anisopliae</i> após 6 dias de desenvolvimento em BDA a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas com os respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade.....	46
6	Descrição das colônias dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> que se desenvolveram a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.....	47
7	Média do comprimento e largura de 50 conídios (micrômetros) dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> desenvolvidos em meio de BDA.....	49
8	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado PL-27, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	51
9	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado PL-43, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ul-	

TABELA

Página

	trâvioleta e resultados da análise estatística.....	52
10	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-286, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	53
11	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-270, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	54
12	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-271, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	55
13	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-272, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ul-	

TABELA

Página

	travioleta e resultados da análise estatística.....	56
14	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-273, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	57
15	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-274, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	58
16	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-275, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	59
17	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-276, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ul-	

TABELA

Página

	travioleta e resultados da análise estatística.....	60
18	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-277, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	61
19	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-278, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	62
20	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-279, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.....	63
21	Dados médios, transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$ da porcentagem de viabilidade de conídios dos isolados de <i>M. anisopliae</i> , sob diferen-	

TABELA

Página

	tes tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados do confronto das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	65
22	Comparação das médias gerais de viabilidade dos isolados de <i>M. anisopliae</i> nos diferentes tempos de exposição à luz ultravioleta, com os respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade.....	67
23	Porcentagens de mortalidade corrigida e acumulada de pré-pupas de <i>D. saccharalis</i> , provocadas pelos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml.....	69
24	Contraste das médias, através do teste de Tukey (5%), dos índices enzimáticos para produção de amilase, protease e lipase, obtidos após incubação a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 5 dias.....	71
25	Número de <i>D. flavopicta</i> e <i>Z. entomiana</i> morta aos 8, 15 e 23 dias após tratamento com o fungo <i>M. anisopliae</i> isolado SPL-272.....	74

TABELA

Página

26	Resultados da análise de variância relativa aos dados de mortalidade de cigarrinhas....	75
27	Médias referentes às mortalidades de <i>D. flavopicta</i> e <i>Z. enteriana</i> aos 8, 15 e 23 dias após tratamento com o fungo <i>M. anisopliae</i> , isolado SPL-272, com seus respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade (interação dias dentro dos tratamentos).....	76
28	Médias referentes às mortalidades de <i>D. flavopicta</i> e <i>Z. enteriana</i> aos 8, 15 e 23 dias após tratamento com o fungo <i>M. anisopliae</i> , isolado SPL-272, com seus respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade (interação tratamentos dentro dos dias).....	77
29	Médias da porcentagem de ninfas mortas e esporuladas pelo fungo <i>M. anisopliae</i> após 8 dias de aplicação.....	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Câmara de irradiação: (a) placas de Petri com meio BDA, nas quais foram semeadas <u>co</u> nídios de <i>M. anisopliae</i> ; (b) bulbo da lâmpada emissora de luz ultravioleta (2.537Å) ..	24
2	Câmara de inoculação de plástico: (a) suporte de arame; (b) tampa desmontável; (c) base.....	28
3	Flutuação populacional de adultos de cigarrinhas-das-pastagens, na região de <u>Ron</u> donópolis, MT, 1983/85.....	40
4	Total de formas biológicas e mortalidade natural de adultos e ninfas de <i>D. flavopicta</i> e <i>Z. entomiana</i> pelo fungo <i>M. anisopliae</i> , durante o período de dezembro de 1983 a abril de 1985.....	43
5	Índices enzimicos para produção de amilase, lipase e protease dos diferentes <u>isola</u> dos, obtidos após incubação a $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias e fotoperíodo de 16 horas...	72

FIGURA

Página

6	Porcentagem de ninfas mortas e esporuladas pelo fungo <i>M. anisopliae</i> após 8 dias de a- plicação.....	79
---	--	----

ESTUDOS DE ISOLADOS DE
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN, 1883
PARA CONTROLE DE CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS

VALDIVINO ENEDINO BORGES

DR. SÉRGIO BATISTA ALVES

- ORIENTADOR -

RESUMO

A presente pesquisa visou estudar a flutuação populacional de cigarrinhas, a ocorrência natural do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, assim como caracterizar e selecionar isolados do fungo visando o controle das cigarrinhas-das-pastagens no Estado de Mato Grosso.

O experimento de campo foi instalado em pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.), na Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT. Os experimentos de laboratório foram desenvolvidos no Setor de Patologia dos Insetos, do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

A flutuação foi efetuada a partir de amostras quinzenais através de coleta de adultos com rede de varredura, dando-se 100 redadas distribuídas em 4 pontos ao acaso

por parcela de 1500 m².

Constataram-se 2 espécies de cigarrinhas no local do ensaio: *Deois flavopicta* (Stal, 1854) e *Zulia entneriana* (Berg., 1879), com predominância da primeira, verificando-se os maiores níveis da população da praga e de doença no período de dezembro a janeiro.

A caracterização do fungo baseou-se em estudos de produção de conídios, crescimento micelial das colônias, aspectos morfológicos e culturais, quando submetidas à temperatura de 26±0,5°C, tamanho dos conídios e das colônias que desenvolveram em meio de cultura BDA, estudos de resistência à luz ultravioleta (2.537Å) e através de bioensaio, utilizando *Diatraea saccharalis* como inseto teste.

Foram estudadas também as atividades amilolítica, proteolítica e lipolítica em meios de cultura sólidos, não encontrando-se correlação entre virulência e atividade enzimica, porém, a maior atividade amilolítica ocorreu em um dos isolados mais virulentos (SPL-272).

Com os resultados obtidos nos diferentes ensaios, foi escolhido o isolado SPL-272 para a execução dos testes de campo. A sua produção foi feita em substrato de arroz, sendo que decorridos 15 dias da semeadura no referido substrato o material foi aplicado no campo.

O produto foi testado em 4 dosagens: 7,3 g/ha (10¹⁰ conídios/ha), 684 g/ha (7,5 x 10¹² conídios/ha), 1000 g/ha (1,1 x 10¹³ conídios/ha) e 1368 g/ha (1,5 x 10¹³ conídios/ha),

efetuando-se apenas uma aplicação.

As doses do fungo *M. anisopliae* que apresentaram maior eficiência a nível de campo foram: 1000 g (44% mortalidade) e 1360 g (66% mortalidade) por ha, respectivamente.

As mortalidades foram avaliadas aos 8, 15 e 23 dias, após aplicação, sendo que a melhor época para se efetuar as amostragens foi após 8 dias.

A STUDY OF DIFFERENT STRAINS OF
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN, 1883
FOR CONTROLLING THE SPITTLEBUGS

VALDIVINO ENEDINO BORGES
- AUTHOR -

DR. SÉRGIO BATISTA ALVES
- ADVISER -

SUMMARY

The objective of this research was to study populational fluctuation of spittlebugs and the natural occurrence of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, together with characterization and selection of strains for controlling the spittlebugs in the State of Mato Grosso, Brazil.

The field experiments were carried out in pastures of *Brachiaria decumbens* Stapf on the Guarita Ranch in Rondonópolis, State of Mato Grosso. The laboratory experiments were carried out in the Insect Pathology Laboratory of the Department of Entomology of Superior School of Agriculture "Luiz de Queiroz", in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil.

Population fluctuation was determined by biweekly samples of net collected adult spittlebugs that were

obtained from a 100 swept get distributed in 4 random sites over a 1,500 m² area.

Two species of spittlebugs were found on the experimental site: *Deois flavopicta* (Stal, 1854) and *Zulia etheriana* (Berg., 1879) the former being predominant.

It was also verified that spittlebugs populational levels and frequency of the fungus were highest in December and January.

The characterization of the strains of the fungus was based upon conidium production, mycelium growth, morphological aspects of the cultures when submitted to a temperature of 26±0.5°C, conidium size of colonies grown on PDA medium and ultraviolet light (2,537⁰Å) resistant and studies using *Diatraea saccharalis* as a test insect for the bioassays.

Amylase, protease and lipase activity of cultures grown on solid medium was not generally found to be correlated with virulence. Although, the most virulent strain SPL-272 did present the highest amylase activity.

Based on all of the above laboratory studies the SPL-272 strain was chosen for the field tests. The strain was first cultivated for 15 days on rice substrate and then applied to the pasture. The fungus was tested at four dosage levels: 7.3 g/ha (10¹⁰ conidia/ha), 684 g/ha (7.5x10¹² conidia/ha), 1,000 g/ha, 1363 g/ha (1.1x10¹³ conidia/ha) with a single application.

The most efficient dosages of the fungus *M. anisopliae* were found to be 1,000 g (44% mortality) and 1,360 g (66% mortality)/100 ha respectively.

Spittlebugs mortality was evaluated at 8, 15 and 23 days after field application. The 8th day was found to be the best sampling time.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 10 milhões de hectares de pastagens na tivas e cultivadas do Brasil, vem sendo anualmente danificadas pela intensa ocorrência das cigarrinhas.

Os prejuízos provocados variam entre 10 e 100%, dependendo das espécies, do tipo de gramíneas, das condições atmosféricas e do manejo utilizado nas pastagens. COSENZA (1984) relatou que as cigarrinhas-das-pastagens ocasionaram prejuízos da ordem de 2,1 trilhões de cruzeiros.

O aumento das populações de cigarrinhas nos últimos anos tem sido unanimemente atribuído a um desequilíbrio biológico desencadeado a partir do desmatamento e implantação de enormes áreas de pastagens exóticas, as quais vêm se mostrando altamente suscetíveis à praga.

Também, o manejo inadequado dessas áreas tem contribuído para o aumento e disseminação da praga.

As principais espécies de cigarrinhas são: *Deois flavopicta* (Stal, 1854), *Zulia entreriana* (Berg., 1879), *Deois incompleta* (Walker, 1851) e *Deois schach* (Fabricius, 1787); sendo que sempre ocorre a predominância de uma das espécies conforme a região do país. Entretanto, todas causam danos semelhantes às gramíneas, provocados pela ação das ninfas as quais sugam a seiva das plantas tornando-as debilitadas. Também, os adultos além de sugarem a seiva injetam uma substância tóxica que promove o bloqueio dos tecidos condutores de seiva, ocasionando uma plesionecriose e posteriormente a morte dos tecidos. Por esse motivo, esses insetos vêm sendo apontados como o elemento mais importante na degradação das pastagens.

O controle biológico, natural ou aplicado tem sido responsável por uma parcela significativa no sucesso do controle integrado de pragas. Dentre os agentes mais promissores nesse campo destacam-se os entomopatógenos, os quais pela sua razoável especificidade não ocasionam efeitos prejudiciais nos agroecossistemas.

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. vem sendo estudado como um agente excepcional no controle de pragas e principalmente como um auxiliar valioso no controle das diversas espécies de cigarrinhas.

As pesquisas básicas sobre a praga e o fungo estão se intensificando nos últimos anos no tocante à obtenção de informações sobre a biologia e ecologia de ambos, visando ao aprimoramento das medidas de controle.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo estudar a flutuação populacional das cigarrinhas, a ocorrência natural do fungo, assim como caracterizar e selecionar isolados do *M. anisopliae* visando o controle das cigarrinhas-das-pastagens no Estado do Mato Grosso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CLASSIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales, família Moniliaceae. Foi descrito por Metschnikoff em 1879 como *Entomophthora anisopliae* Metschnikoff, citado por PETCH (1931) e KENDRICH (1971). Posteriormente por sugestão do botânico CIEKOWISKY o fungo foi denominado *Isaria destructor*; após uma série de controvérsias, com a proposição de diversos sinônimos, finalmente foi transferido para o gênero *Metarhizium* em 1983 por SOROKIN (GUAGLIUMI *et alii*, 1974). Assim, sua designação atual é *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.

MARCHIONATO (1942) observou que este fungo pode apresentar conídios cilíndricos de 8 a 9 por 2,5 a 3 micrô-

metros. Por outro lado, BARNETT (1960) observou variações que vão de ovóides a cilíndricos, unicelulares, hialinos ou levemente pigmentados, dando ao conjunto um aspecto verde-oliva.

Johnson em 1915 diferenciou as formas *major*, com conídios de 11,9 por 3,00 micrômetros, e a *minor* com conídios de 3,5 por 2,0 a 3,0 micrômetros, as que ocorrem sobre diferentes hospedeiros; observou também que existem variações de comprimento num mesmo isolado devido as diferenças fisiológicas (STEINHAUS, 1949 e TULLOCH, 1976). Segundo LATCH (1965) estas categorias *major* e *minor* foram propostas por Friederichs (1920) o qual relatou que besouros, *O. rhinoceros*, provenientes de Samoa, apresentavam uma linhagem com conídios de 9,0 a 14,0 por 3,3 micrômetros e outros de Madagascar possuíam outra linhagem diferente, apresentando conídios de 6,0 a 8,0 por 2,5 micrômetros.

Foi demonstrado que o fungo possui conídios uninucleados (VEEN, 1968 e TINLINE e NOVIELLO, 1971), sendo os conidióforos igualmente uninucleados no início do seu desenvolvimento.

Entretanto, MESSIAS *et alii* (1978) constataram através de corantes uma proporção de 95% de conídios uninucleados e 5% para conídios binucleados em estudos efetuados com a linhagem E6.

Segundo BARON (1968) o fungo *M. anisopliae* apresenta uma formação semelhante a um esporodóquio agregado a hifas entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos

simples ou, mais frequentemente, ramificados, resultando em células conidiogênicas chamadas fiálides, sendo estas cilíndricas, hialinas e afiladas no ápice. Entretanto, HAMMIL (1972) fez um estudo sobre as fiálides de *M. anisopliae*, definindo-as como células conidiogênicas que produzem pelo menos o seu primeiro conídio entre a extensão apical da células, o qual é liberado pela ruptura da parede celular. Observou também, que as fiálides deste fungo são geralmente cilíndricas e levemente entumescidas antes de afilarem rapidamente para um estreito ápice conidiogênico de no máximo 1 micrômetro. Após um conídio ter sido delimitado por um septo, ele move-se para fora do colo da fiálide e o próximo conídio começa a formar-se. As organelas penetram nos conídios e os mesmos são delimitados por septos, continuando o processo.

Alguns isolados não formam esporódóquios, mas apresentam esporulação abundante, constituindo uma placa verde oliva aderida ao micélio.

Os meios de cultura e técnicas usuais em laboratório permitem, com facilidade, o cultivo e manutenção de *M. anisopliae*. Desenvolve-se entre 7 e 35°C, mas a temperatura ótima é por volta de 28°C (VILLACORTA, 1978). É tolerante à faixa de pH 2,0 a 8,5, porém 6,9 é a melhor condição para crescimento e esporulação. Umidade relativa acima de 95% permite germinação dos esporos (VEEN, 1968).

Na natureza, é uma espécie bastante cosmopolita, encontrando-se disseminada desde a Rússia até a Argenti-

na, quer parasitando uma larga gama de insetos hospedeiros, quer vivendo saprofiticamente no solo.

2.2. EMPREGO DO *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE INSETOS

O primeiro trabalho de controle, que produziu mas salmente o fungo para iniciar epizootia na população de *Cleo-nus punctiventris* Germ., curculionídeo, praga da beterraba, foi realizado por Metschnikoff em 1880. No ano de 1884, Krassil-tschik, dando sequência às pesquisas, chegou a produzir 55 kg de fungo em 4 meses, conseguindo controlar de 55 a 80% dos inse-tos em pequenas áreas após 10 a 15 dias de aplicação (MARTIGNO NI, 1968; LATCH, 1965; BALFOUR-BROWNE, 1960).

Segundo DeBACH (1968), Koebele em 1897 fez os pri-meiros trabalhos práticos com o fungo *Metarhizium* nos Estados U-nidos. FARGUES *et alii* (1975) cita que este patógeno pode ata-car cerca de 204 espécies de insetos. Porém, atualmente sabe-se que esse número é bem maior.

BALFOUR-BROWNE (1960) relatou que Mathlei e Lih-nell (1944) aplicaram uma suspensão de conídios em água sobre as paredes dos depósitos de armazenamento e obtiveram 40% de con-trole da traça dos grãos, *Tinea secalella* Zacher.

DAOUST e ROBERTTS (1982), estudando a patogenici-dade do fungo, verificaram o comportamento quanto ao potencial

de virulência de 52 linhagens de *M. anisopliae* originadas de 9 países diferentes e isoladas de insetos pertencentes a 4 gêneros, das ordens Lepidoptera, Orthoptera, Homoptera e Coleoptera. Observaram que as linhagens do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, quando utilizadas contra *Culex pipiens* apresentaram uma variação na eficiência que variou de 0-100%, sendo que as mais virulentas eram linhagens pertencentes à variedade *anisopliae* ^{ou minor}, originadas da Austrália, Áustria e Brasil, enquanto que as linhagens pertencentes a variedade *major* foram quase que avirulentas.

No Brasil, o fungo *M. anisopliae* vem sendo utilizado com bons resultados, para o controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar, no Nordeste.

Em Pernambuco, AQUINO (1974) constatou, em um ensaio experimental com *M. anisopliae* em cana-de-açúcar, que o correu parasitismo pelo fungo 5 dias após sua aplicação, sendo observada a sua permanência na área por mais de 18 meses, causando diferente graus de infecção em ninfas e adultos de cigarrinhas da cana.

MACEDO *et alii* (1977) usando pulverizações de *M. anisopliae* (450 g/3.600 m²) no controle de *Mahanarva fimbriolata* na região de Ribeirão Preto, obtiveram após 4 e 8 semanas, 23,36 e 41,49% de mortalidade, respectivamente, concluindo que o fungo pode ser usado com sucesso nos programas de controle.

Segundo MARQUES *et alii* (1981), nos Estados de

Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, a área total de cana tratada com *Metarhizium*, 1980 pelo IAA/PLANALSUCAR, foi de 101.105 hectares, conseguindo mortalidade de 23% de ninfas e 40% de adultos nas populações de *Mahanarva posticata*, constituindo-se no principal método de controle desta praga. ALVES *et alii* (1982) constataram a ocorrência epizootica do *M. anisopliae* em Alagoas, na região de Cachoeira do Meirim, atacando 56,4% de formas biológicas de *Mahanarva posticata*, o que corresponde a uma produção de 4,9 kg de esporos "naturais" por hectare.

A utilização de *M. anisopliae* para o controle de cigarrinha das pastagens é muito discutida, apresentando resultados bastante controvertidos, provavelmente, por não se considerar detalhes como utilização de isolados a partir de material provenientes da região, bem como formulações e dosagens adequadas.

Assim, VEIGA e ARRUDA (1972), constataram que a utilização do fungo como agente de controle microbiológico das cigarrinhas, foi altamente eficiente. Porém existem trabalhos tal como o de PACHECO e BERNARDES (1976) os quais testaram 3 concentrações de *M. anisopliae* contra *Z. enteriana*, no Espírito Santo, não obtiveram resultados positivos devido a falta de umidade na época de aplicação do fungo e a baixa densidade populacional do hospedeiro. SILVA e MAGALHÃES (1980) não obtiveram resultados satisfatórios trabalhando com 2 isolados de *M. anisopliae* nas quantidades de 1.000, 500 e 250 g de massa fún-

gica/ha, na formulação pó seco, para controle de *Deois incompleta* (Walk.), porém não informaram no trabalho a quantidade de conídios existentes nas diversas dosagens empregadas e nem a viabilidade dos mesmos.

Por outro lado, VEIGA (1979) obteve excelentes resultados no controle de *A. selecta* em Pernambuco, conseguindo níveis de 65 a 96% de eficiência.

Segundo VENTURA e MATIOLI (1980), o fungo *M. anisopliae* foi encontrado sobre os gêneros *Zulia* e *Deois*, provocando epizootias em condições naturais no Estado do Espírito Santo.

ALVES (1982) usando 100 g de conídios de *M. anisopliae*, isolado SPL-3F, por hectare, com 6×10^9 conídios/grama obteve controle de 60% de adultos de *D. flavopicta*.

Também, ALVES (1984) sugeriu a utilização do *M. anisopliae* em um programa de controle integrado das cigarrinhas das pastagens, considerando isolados, manejo, inimigos naturais, defensivos agrícolas, etc.

GUAGLIUMI *et alii* (1974), foi o primeiro pesquisador a fazer referência sobre *M. anisopliae* colonizando *Diatraea* spp., em áreas de canaviais submetidas a tratamentos com o fungo para o controle de cigarrinhas. Posteriormente, ALMEIDA e ALVES (1982) obtiveram mortalidade da ordem de 100% para lagarta da broca da cana, quando inoculada com um potencial de 10^6 conídios por lagarta, caracterizando o *M. anisopliae* como possível agente controlador e sugerindo o seu uso em programas

de controle biológico dessa praga.

Com referência ao controle de *Metamasius hemipterus* (Linn.), VENTURA *et alii* (1980) em condições de laboratório, obtiveram mortalidade de 97,7% com uso de *M. anisopliae*.

2.3. CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae*

Em geral, a classificação dos fungos entomopatog_{en}os é baseada em critérios morfológicos. No entanto, recentemente, conhecimentos adicionais quanto à virulência, especificidade, e outros caracteres fisiológicos tornaram-se indispensáveis para uma caracterização precisa de isolados de fungos.

TULLOCH (1976) citou que Friederichs (1930), propôs o nome *Cryptophagum* para conídios longos.

PETCH (1931) citou vários autores que realizaram medições de conídios, e concluiu que é possível diferenciar as subespécies ou variedades pelas formas de conídios com pridos ou curtos.

ROCKWOOD (1950) observou diferentes raças do fungo desenvolvendo-se sobre vários insetos, mas não encontrou diferenças notáveis quando ao tamanho dos conídios.

MESSIAS e AZEVEDO (1980), realizando estudos sobre a genética do mesmo fungo, determinaram que tanto as raças haplóides como as diplóides não devem ser distinguidas, baseando-se nas medições dos conídios. Os mesmos autores (1981) con-

cluíram que a determinação do tamanho dos conídios através de microscopia óptica, pode auxiliar nas diferenciações dos isolados haplóides e diplóides, e que o tamanho também pode ser influenciado pelo número de núcleos presentes nos conídios.

ALVES (1982), efetuando a caracterização de 9 isolados de *M. anisopliae*, observou variações no comprimento dos conídios de 7,20 a 10,05 micrômetros, com média de 7,9; sendo que um dos isolados poderia ser classificado como pertencente a variedade *major*.

A capacidade de produção de enzimas dos fungos entomopatogênicos tem sido estudada com várias finalidades, sendo uma delas a de correlacioná-la com os processos de patogênese e virulência.

COCHRANE (1958) citou que Leopold e German, determinaram que *M. anisopliae* produz uma enzima denominada protopectinase, capaz de converter as protopectinas em ácido pectínico solúvel em água.

RATAULT e VEY (1977) efetuando estudos histológicos, verificaram produção de esterases e N-acetil-glucosaminase no processo de penetração das hifas de *M. anisopliae*, no tegumento de *O. rhinoceros*.

Visando o controle biológico das cigarrinhas-das-pastagens MESSIAS *et alii* (1978) estudaram também alguns aspectos biológicos de 11 isolados de *M. anisopliae*, agrupando-os em 5 padrões eletroforéticos e através de radiação ultra-

violeta como agente mutagênico, obtiveram mutantes para produção de aminoácidos e vitaminas.

CONTI *et alii* (1980) observaram que 11 linhagens selvagens de *M. anisopliae* originadas dos estados da Bahia, São Paulo, Pernambuco e Espírito Santo, apresentaram - se homogêneas quando testadas eletroforeticamente para fosfatase e heterogêneas quando testadas em relação à esterase, podendo distinguir 5 tipos diferentes.

ROSATO *et alii* (1981) verificaram a produção de enzimas extracelulares em isolados de *M. anisopliae* procedentes de diferentes regiões geográficas do Brasil. Usando substratos específicos foram ensaiadas produções de amilase, lipase, quitinase e protease de 10 isolados provenientes de diversos Estados. Verificaram que no geral os isolados de uma mesma região, apresentaram índices enzimicos similares, embora índices similares também tenham ocorrido em isolados geograficamente distintos.

Por meio da produção, tamanho dos conídios, viabilidade, características das colônias e bioensaios com *G. mellonella* e *D. saccharalis*, ALVES (1982) realizou a caracterização e padronização de 9 isolados de *M. anisopliae* provenientes de diferentes regiões do Brasil, elaborando um perfil para cada isolado, baseando-se no padrão eletroforético e nas características biológicas e bioquímicas estudadas. O isolado SPL-3F foi adotado como padrão para os testes de patogenicidade e agressividade, correspondendo a 1.000 unidades padrão de potên-

cia (UP) em *G. mellonella*, equivalentes a 54% de mortalidade em cigarrinhas *D. flavopicta*.

SOSA GOMEZ (1983), visando o controle microbiológico de insetos, também realizou estudos de caracterização e padronização de 11 isolados de *M. anisopliae*, procurando selecionar os mais patogênicos e produtivos. A caracterização fundamentou-se em produção de conídios, aspectos morfológicos culturais, produção em meio de arroz, tamanho dos conídios e das colônias e resistência à luz ultravioleta ($2.537\text{\AA}$). Os insetos utilizados nos bioensaios foram *D. saccharalis*, *G. mellonella* e *Tenebrio molitor* concluindo que a linhagem SPL-52T apresentou maior produção de conídios em BDA e arroz, alta virulência para os 3 insetos testados, alta resistência à radiação ultravioleta.

MESSIAS *et alii* (1983) conseguiram utilizar o método de cromatografia gasosa por pirólise para identificar isolados de *M. anisopliae* pertencentes às variedades *anisopliae* e *major*.

2.4. SENSIBILIDADE DO *Metarhizium anisopliae* À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Os inseticidas microbianos após serem aplicados nas culturas, encontram-se expostos a fatores ambientais, que podem inativá-los. ALVES (1980) citou que a luz solar é o fator de maior importância, responsável pela instabilidade des-

ses produtos, e o componente luz ultravioleta tem papel preponderante.

IGNOFFO *et alii* (1977) constataram-se em seus trabalhos de pesquisas, o efeito prejudicial da luz ultravioleta sobre protozoários, bactérias, vírus e fungos, mediante testes de patogenicidade.

MESSIAS (1979) estudou os efeitos da luz ultravioleta sobre a linhagem E9 de *M. anisopliae* e obteve a curva de sobrevivência, além disto, selecionou mutantes morfológicos e auxotróficos apropriados para estudos genéticos.

CORRÊA (1982) estudou a inativação de conídios de *M. anisopliae* em interação com 2 tipos de solos de composição e textura diferentes, obtendo-se maior inativação em solos argilosos.

SANTOS (1978) obteve uma sobrevivência de 1 a 5% em um tempo igual a 2,40 minutos.

ZIMMERMANN (1982) estudou em condições de laboratório, o efeito da luz solar na viabilidade de conídios de *M. anisopliae*, expondo o fungo a uma luz solar artificial.

Através dos resultados, determinou-se que foram necessários 1 hora e 40 minutos de irradiação para inviabilizar 50% dos conídios incubando-os após a irradiação a 25°C e no escuro, por um período de 24 horas.

FRIGO (1983) encontrou que a dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios foi obtida com um tempo de exposição a ultravioleta que foi de 1,95 minutos para a linhagem A₄;

3,60 a 3,80 para Mj e M, respectivamente e entre 7,35 a 7,80 minutos para as linhagens E9, E6 e E9A. No entanto, este tempo está relacionado com a fonte de irradiação.

2.5. PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

Em vista da importância do fungo *M. anisopliae* no controle de pragas, especialmente *Mahanarva posticata*, *Deois schach* e *D. flavopicta*. Verificou-se a necessidade de produzi-lo em maior escala a fim de proceder sua difusão nas diferentes áreas canavieiras ou mesmo em pastagens afetados pela praga.

O fungo *M. anisopliae*, utiliza como fonte de carbono substância como: amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (LIHNELL, 1944; HUBER, 1958).

MOURA COSTA e MAGALHÃES (1974) conseguiram obter crescimento micelial, após 4 dias de semeadura e esporulação entre 8 a 10 dias em meio de cultura à base de farinha de arroz 5% mais ágar em pó a 1% e 100 ml de água destilada. Com este método o Instituto Biológico da Bahia, produziu em aproximadamente 4 meses 2.000 litros de meio.

GUAGLIUMI *et alii* (1974) produziram em média de 15 a 20 g de conídios em garrafa de um litro, com 100 g de arroz, obtendo um máximo de 20 a 25 g em condições ótimas.

Segundo SANTOS (1978) o crescimento micelial das

colônias mantidas no escuro total é maior que nos tratamentos com luz alternada ou constante, entretanto a produção de conídios é maior sob luz contínua do que sob luz alternada ou escuro constante.

Estudando 4 isolados de *M. anisopliae* VILLACORTA (1978) observou diferenças marcantes quanto ao crescimento em diâmetro das colônias de um dos isolados em relação aos restantes, o que indica a possibilidade de ser uma raça diferente.

ALVES *et alii* (1980) constataram que os espectros azul, amarelo, vermelho e luz de planta estimularam o crescimento das colônias e a produção de conídios.

2.6. DINÂMICA POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS

2.6.1. Amostragens e frequência das espécies

As amostragens de ninfas e adultos em geral seguem um padrão, havendo variação no tamanho das amostras e eventualmente no tipo de contagem para quantificação da forma jovem (SILVEIRA MELO, 1982).

Assim GCHOA e VELASCO (1972), FLORES *et alii* (1975) e VELASCO (1975) utilizaram para amostragens de adultos, rede de varredura dando de 25 a 40 redadas por hectare e,

para ninfas e/ou espumas, jogaram na mesma área, um aro de 0,25 m², 40 vezes ao acaso e contaram o número de ninfas e/ou espumas encontradas.

OOMEN (1975) amostrou adultos com rede de 40 cm de diâmetro e para ninfas usou quadros de 0,25 m² em área de 4 m² e espumas em 1 m². MORA e SANTOS (1975) coletaram adultos com 40 golpes de rede de 50 cm de diâmetro e para ninfas demarcaram áreas de 200 m² e fizeram levantamento em 10 áreas de 1m²; MILANEZ (1980) amostrou adultos com rede de 40 cm de diâmetro, dando 500 redadas por hectare e para ninfas amostrou massas de espuma em 5 m² com quadro de 0,1 m²; COTTAS e RAMIRO (1980) utilizaram rede de 38 cm dando 100 redadas por parcela, distribuídas em 2 pontos; CRUZ JÚNIOR *et alii* (1980) amostrando somente adultos utilizaram 40 redadas por hectare, em diagonal. Já EL-KADI (1978) para coleta de adultos, utilizou sugador motorizado, especialmente adaptado para esse fim.

Segundo EL-KADI (1978) a abundância de cigarrinhas no Estado de São Paulo foi de 85% para *Deois flavopicta* e 15% para *Zulia entreriana*, enquanto que MILANEZ (1980) citou para Nova Odessa e Piracicaba, respectivamente, cerca de 34 e 24% de *Deois flavopicta* e 66 e 76% de *Zulia entreriana*; para RAMOS (1976), *Zulia entreriana* foi dominante; em Porto Velho, Estado de Rondônia, OLIVEIRA e CURI (1980) observaram a dominância de *Deois incompleta* e em Minas Gerais, MELO *et alii* (1980) encontraram 49 e 47,3% para *Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*, respectivamente.

Para o Estado de Mato Grosso do Sul, VALÉRIO e OLIVEIRA (1982), em trabalho de levantamento das espécies e níveis populacionais, observaram que as espécies *Zulia entreriana* e *Deois flavopicta* representaram juntas 98,5% das espécies coletadas, com predominância de *Zulia entreriana* na maior parte do Estado.

2.6.2. Flutuação populacional

Normalmente a época de ocorrência de cigarrinhas coincide com o período mais quente e mais úmido do ano. BONA *et alii* (1967), estudando as espécies *Tomaspis flavopicta* e *Monepchora entreriana*, no Estado de São Paulo, verificaram correlação entre precipitação pluvial e o número de insetos coletados. DOMINGUES e SANTOS (1975) confirmaram ser o período chuvoso do ano o ideal para a ocorrência de maior número de adultos e ninfas no Estado do Espírito Santo.

SOUZA (1976) citou que as condições de precipitação pluvial variando de 750 a 1000 mm, temperatura entre 20 e 30°C e altitude de 0 a 1.000 metros favorecem o aparecimento de *Z. entreriana*.

Segundo EL-KADI (1978) no Estado de São Paulo, a atividade da cigarrinha iniciou-se em agosto e foi até o final de maio, sendo que *Z. entreriana* apareceu poucas semanas antes de *Deois flavopicta*. Isto também foi observado por COTTAS

e RAMIRO (1980). Por outro lado, em Nova Odessa e Piracicaba, MILANEZ (1980) constatou que *D. flavopicta* e *Z. entreciana* ocorreram nos períodos de outubro/novembro e abril/junho.

Em Minas Gerais, REIS *et alii* (1978) estudaram a flutuação populacional de adultos de diversas espécies de cigarrinhas-das-pastagens e verificaram que as ninfas ocorriam 15 a 60 dias após o início das chuvas de primavera, com temperatura média em elevação e os adultos surgiram 30 a 70 dias após o início das chuvas e que, em regiões de estações bem definidas, a cigarrinha não ocorreu no inverno; porém em regiões em que as temperaturas eram mais elevadas e com precipitações pluviais de inverno, as cigarrinhas estavam presentes.

Com respeito aos picos populacionais de cigarrinhas-das-pastagens, estes variam com a região. Para o Estado de São Paulo, EL-KADI (1978) observou que os maiores níveis ocorreram em dezembro e março, porém na região do Pontal do Paranápanema (SP), COTTAS e RAMIRO (1980) encontraram maiores picos de dezembro a fevereiro. REIS *et alii* (1980) determinaram em 4 anos de estudos em Minas Gerais, que o pico populacional de ninfas ocorreu em outubro e o de adultos em novembro e janeiro.

3. METODOLOGIA

O experimento de campo foi instalado em pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf. localizada na Fazenda Guarita, município de Rondonópolis a 16°28' latitude S, 54°38' de longitude W, no Estado de Mato Grosso.

Os experimentos de laboratório foram desenvolvidos a partir do material coletado em campo e de material já existente na coleção do Departamento de Entomologia, no Setor de Patologia de Insetos do referido Departamento na ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Equipamentos

. Rede de varredura de 50 cm de diâmetro e aproximadamente 60 cm de profundidade confeccionada com tecido de algodão cru presa em um aro de metal e um suporte de madeira de 1 m de comprimento;

. Quadro de 50 cm de lado, construído com sarrafos de madeira;

. Gaiolas teladas sem fundo com 50 cm de lado;

. Placas de Petri com 6 cm de diâmetro e 2 cm de altura;

. Capela de fluxo vertical marca VECO, modelo VLFS-09;

. Estufa incubadora BOD, marca FANEM, modelo 347-G, equipada com lâmpada fluorescente modelo F15-T12/LD;

. Balança analítica marca METTLER com indicadores digitais, modelo PB-300 e balança analítica marca BOSCH, com indicadores digitais, modelo S-2000

. Medidor de pH digital, marca MICRONAL, modelo 10 B-272;

. Agitador elétrico, marca ETICA, com capacidade de 108 a 310 rotações por minuto;

. Microscópio-estereoscópico marca WILD;

. Microscópio comum marca OLYMPUS;

. Câmara de Neubauer;

. Câmara de irradiação equipada com lâmpada germicida modelo G15-T8, com emissão de ondas de $2.537\text{\AA}$ de comprimento. Construída com papelão com as seguintes dimensões: 37 cm de largura por 45 cm de comprimento e 35 cm de altura. Distância do bulbo às placas: 30 cm (Figura 1).

. Câmara de inoculação de plástico, de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura segundo SOSA GOMEZ e ALVES (1983), (Figura 2).

. Pulverizador de barra tracionado a trator.

. Outros materiais: baldes plásticos, provetas, estacas, estufas de esterilização a seco, alça de platina, alça de Drigallsky, algodão, álcool, solução de hipoclorito de

sódio, Streptomicina, água destilada, pinças, papel alumínio, erlenmeyer, becher, peneiras com 100 mesh, pipeta automática modelo Pipemat de 5 e 10 microlitros.

Figura 1 - Câmara de irradiação: (a) placas de Petri com meio BDA, nas quais foram semeados conídios de *M. anisopliae*; (b) bulbo da lâmpada emissora de luz ultravioleta (2.537Å) (SOSA GÓMEZ *et alii*, 1984).

3.1.2. Isolados do fungo *Metarhizium anisopliae*

Os isolados utilizados no trabalho, procedência, hospedeiros originais e datas de coleta constam na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, respectivas procedências, hospedeiros originais e datas de coleta.

Denominações*	Procedências	Hospedeiros originais	Data de coleta
PL-27	Fazenda Charles - Mal. Deodoro - Alagoas	<i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr.)	17.06.81
PL-43	Fazenda Papuá, Usina Peixes, Flexeiras; AL	<i>Mahanatva posticata</i> (Stal)	05.08.81
SPL-286	Fazenda Biguaçu, Biguaçu, SC	<i>M. posticata</i> (Stal)	19.06.84
SPL-270	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-271	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-272	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-273	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-274	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-275	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-276	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-277	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-278	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84
SPL-279	Fazenda Guarita, Rondonópolis, MT	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	17.02.84

* Os números representam a ordem de entrada do material no Laboratório de Patologia de Insetos - ESALQ/USP.

Os isolados foram purificados e conservados em temperatura em torno de $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em tubos tombados com meio de cultura e em água destilada esterilizada.

3.1.3. Meios de cultura

. Meio BDA

batata inglesa.....	200 g
dextrose.....	15 g
ágar.....	20 g
sulfato de streptomicina.....	0,25 g
água destilada.....	1000 ml

. Meio para determinação da atividade amilolítica

ágar nutriente "Difco".....	23 g
amido solúvel.....	2 g
água destilada.....	1000 ml

. Meio para determinação da atividade lipolítica

peptona "Difco".....	10 g
"Tween 20.....	10 ml
cloreto de sódio.....	5 g

cloreto de cálcio di-hidratado...	0,1 g
ágar granulado.....	20 g
água destilada.....	1000 ml

. Meio para determinação da atividade proteolítica

leite em pó desnatado.....	23 g
ágar nutriente "Difco".....	23 g
água destilada.....	1000 ml

Todos esses meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 30 minutos. O pH foi ajustado com hidróxido de sódio para 6,8.

. Meio para produção de conídios

arroz beneficiado.....	200 g
------------------------	-------

O arroz foi cozido durante 10 minutos, e posteriormente autoclavado a 125°C por 30 minutos em sacos plásticos de polipropileno de 35 cm x 23 cm.

3.1.4. Insetos utilizados nos bioensaios

Foram utilizados *Diatraea saccharalis* (Fabr.) no estágio de pré-pupas provenientes da criação do laboratório de

Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR, criadas em dieta artificial de HENSLEY e HAMMOND modificada pelo IAA/PLANALSUCAR (MENDES *et alii*, 1980).

Nos ensaios de campo utilizaram-se adultos de *Deois flavopicta* (Stal) coletados nas parcelas pulverizadas com o fungo.

Figura 2 - Câmara de inoculação de plástico: (a) suporte de arame; (b) tampa desmontável; (c) base.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas

O levantamento foi efetuado através de amostra-

gens quinzenais utilizando-se para a coleta de adultos rede de varredura, dando-se 100 redadas distribuídas em grupos de 25 em 4 pontos ao acaso, por parcela de 1.500 m².

O material biológico coletado, depois de contado, foi observado em lupa para a identificação da espécie, sendo as espécies pouco comuns enviadas para especialistas.

3.2.2. Determinação da ocorrência natural do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre cigarrinhas

A determinação do nível natural da doença foi realizada na mesma área experimental, em uma fase anterior do experimento de dose. Os levantamentos foram efetuados mensalmente, determinando a ocorrência do fungo em ninfas e adultos, tendo sido realizadas observações quanto a mortalidade de ninfas e de adultos por parcela.

Para constatação dessa mortalidade, foram tomadas 4 amostras de 0,25 m² por parcela onde procurou-se observar o número de ninfas e cigarrinhas vivas e mortas. Para se determinar o agente responsável pela morte dessas formas biológicas, tomaram-se 5 exemplares, ao acaso, das cigarrinhas e ninfas coletadas em cada parcela as quais foram colocadas em placas de Petri com algodão úmido com a finalidade de se observar o possível crescimento do fungo.

3.2.3. Produção de conídios e características culturais de 13 isolados de *Metarhizium anisopliae* em meio de BDA

Com a finalidade de se determinar a produção de conídios dos 13 isolados sob a temperatura de $26 \pm 0,5$ procedeu-se à inoculação dos isolados em 3 pontos por placa, utilizando-se 3 placas para cada isolado. O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, sendo que cada tratamento constou de 5 repetições.

As placas foram mantidas em estufas de incubação (BOD) e com fotoperíodo de 16 horas.

Decorridos 6 dias, determinaram-se além do diâmetro das colônias, a sua produção de conídios. Para tal cortaram-se perimetralmente as colônias, das quais foram retirados os conídios mediante lavagem com 10 ml de água esterilizada mais um agente molhante.

Nessa suspensão, procedeu-se a contagem dos conídios produzidos em cada colônia. Da suspensão tomou-se uma amostra, a qual foi levada à câmara de Neubauer, onde foram contados os conídios presentes em 16 campos/repetição. Desta maneira, foi obtido o número de conídios por ml, o que possibilitou estimar o número total de conídios por colônia.

Para análise estatística os dados de produção de conídios $\times 10^7$ foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ sendo feita análise de variância e teste de Tukey.

3.2.4. Medição dos conídios dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Conídios provenientes dos 13 isolados, produzidos sobre meio de BDA foram medidos determinando comprimento e largura. As medidas foram realizadas com um microscópio óptico, equipado com uma ocular micrométrica (10 aumentos) em combinação com uma objetiva (40 aumentos). Para determinação das dimensões montaram-se lâminas de diferentes isolados, tomando-se as medidas de 50 conídios por isolado.

3.2.5. Efeito da radiação ultravioleta sobre os diferentes isolados do *Metarhizium anisopliae*

Determinou-se a sensibilidade natural dos diferentes isolados de *M. anisopliae* à radiação ultravioleta, submetendo-se os conídios a doses crescentes de exposição à mesma. Para tal, utilizou-se uma fonte de luz ultravioleta composta de uma lâmpada do tipo G15-T8, instalada dentro da câmara de irradiação.

Os conídios foram transferidos para placas de BDA, em uma quantidade equivalente a duas alças de platina/placa adicionando 10 microlitros de uma solução de água esterilizada e agrida a 1%.

O fungo foi espalhado nas placas com o auxílio de uma alça de Drigallsky. Em seguida, realizou-se a irradiação sobre as placas abertas a uma distância de 30 cm da fonte.

Os tempos de exposição dos conídios à radiação foram de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75 e 85 segundos, além da testemunha sem exposição.

Após a irradiação, as placas foram mantidas a uma temperatura de $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Foram preparadas duas placas para cada isolado e para cada dose de radiação, uma das quais representava testemunha. Cada placa foi dividida em 4 setores para contagem dos conídios germinados e não germinados, constituindo assim 4 repetições.

A contagem dos conídios foi realizada 24 horas após a irradiação com o auxílio de um microscópio, contando-se separadamente os conídios germinados e não germinados, até que o número de um deles atingisse 200, encerrando-se assim a contagem da repetição. Essa contagem foi feita por observação das placas.

Posteriormente, foi calculada porcentagem de viabilidade dos conídios para análise de variância e confronto das médias pelo teste de Tukey.

3.2.6. Bioensaio com *Diatraea saccharalis*

Os inóculos necessários para a realização do bioensaio foi obtido através da multiplicação dos isolados em

meio de BDA. Após 15 dias da semeadura no referido substrato, os conídios foram separados por lavagem com água destilada esterilizada e agrid 1% e acondicionados em um Erlenmeyer. Posteriormente, calibrou-se o inóculo dos 13 isolados a uma concentração em torno de $1,2 \times 10^8$ conídios viáveis/ml. Em seguida, com o auxílio da câmara de inoculação, trataram-se 30 indivíduos durante 3 segundos por duas vezes consecutivas, por imersão, utilizando-se inóculo de cada isolado.

Após a inoculação, as lagartas foram colocadas individualmente em caixas plásticas de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura e mantidas em temperatura de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e em condições de umidade próxima à saturação.

Observaram-se diariamente as mortalidades, confirmando o diagnóstico através dos sinais do patógeno (conidíoforos e conídios).

Através destes dados determinaram-se as mortalidades corrigidas usando a fórmula de ABBOTT.

3.2.7. Determinação da capacidade de produção de enzimas dos isolados de *Metarhizium anisopliae*

No processo empregado para se estudar a capacidade de produção de enzimas dos diferentes isolados de *M. anisopliae*, utilizaram-se de meios de cultura sólidos visando determinar as atividades: amilolítica, lipolítica e proteolítica.

Para tal, inocularam-se o fungo em 3 pontos por placa contendo o meio de cultura específico para cada teste, com o auxílio de uma alça de platina. Foram utilizadas duas placas por isolado e por teste, totalizando assim, 6 repetições por tratamento.

As técnicas utilizadas para testar as diferentes atividades enzimáticas foram descritas por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), no entanto para o teste de atividade proteolítica seguiu-se a técnica segundo GABRIEL (1968).

As placas após serem inoculadas foram levadas à estufa de incubação (BOD) regulada a $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, onde desenvolveram as colônias produzindo seus halos correspondentes, os quais refletiram as atividades enzimáticas de cada isolado.

Para efeito de comparação entre os tratamentos procedeu-se à medida dos diâmetros das colônias e os halos respectivos decorridos 5 dias após a instalação do ensaio. Determinou-se a atividade enzimática pela relação diâmetro da colônia pelo diâmetro do halo produzido.

3.2.8. Utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes doses para controle de cigarrinhas

Os trabalhos foram realizados em 2 etapas, sendo que a primeira constou da coleta de formas biológicas mor-

tas pela ocorrência natural do fungo nas pastagens. Esses insetos foram levados para o Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, onde foram feitos os isolamentos, purificações, padronizações e testes de patogenicidades com 10 isolados visando escolha do isolado mais adequado ao controle microbiano. Na segunda etapa, o isolado que apresentou melhores características foi multiplicado em substrato de arroz. Decorridos 15 dias da semeadura no referido substrato o material foi conduzido para o campo, onde os conídios foram removidos com água mais espalhante e depois separados por peneiramento, obtendo-se um pó constituído por esporos mais uma porção do meio de cultura. Em seguida efetuou-se a quantificação das suspensões com uma câmara de Neubauer obtendo-se as seguintes dosagens:

. Tratamento A	7,3 g/ha ..	10^{10} conídios/ha
. Tratamento B	681 g/ha ..	$7,5 \times 10^{12}$ conídios/ha
. Tratamento C	1000 g/ha ..	$1,1 \times 10^{13}$ conídios/ha
. Tratamento D	1363 g/ha ..	$1,5 \times 10^{13}$ conídios/ha
. Tratamento E	Testemunha (sem fungo)	

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 5 tratamentos e 4 repetições. Para cada parcela foi delimitada uma área de 1.500 m², separadas por uma bordadura de 5 metros entre as parcelas e bordaduras de 8 metros entre os blocos.

A aplicação do fungo foi realizada por via líquida utilizando-se de um pulverizador de barra tracionado a trator, usando-se 240 litros de água/ha.

As avaliações foram feitas em 4 áreas de 0,5 m² por tratamento, onde foram colocadas gaiolas teladas sem os fundos.

Dentro dessas gaiolas colocaram-se 50 adultos coletados em cada parcela, imediatamente após as pulverizações, perfazendo um total de 200 adultos por tratamento. As avaliações da mortalidade foram feitas aos 8, 15 e 23 dias após a pulverização.

As cigarrinhas mortas foram colocadas em câmara úmida, para se verificar a esporulação e posterior isolamento do patógeno.

Para a avaliação da mortalidade das ninfas demarcaram-se antes da aplicação do fungo 5 espumas por parcela perfazendo um total de 20 espumas por tratamento. Decorridos 8 dias da pulverização, realizaram-se as contagens de ninfas mortas e vivas nos locais demarcados. Os insetos foram levados ao laboratório para constatação da infecção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE CIGARRINHAS

Na região de Rondonópolis, nos anos agrícolas de 1983/84 e 1984/85, houve predominância das espécies *Deois flavopicta* (Stål, 1854) e *Zulia entreciaria* (Berg., 1879).

No decorrer da pesquisa observaram-se que fêmeas e machos de *D. flavopicta* e *Z. entreciaria* apresentavam um polimorfismo alar, que consiste na presença de outras faixas ou listras brancas nas asas. VALÉRIO (1979 e 1982) havia observado esse fenômeno em pastagens do Mato Grosso do Sul. PERONDINI *et alii* (1979), relacionaram as variações nos padrões de asas que ocorrem nas duas espécies, com a codificação de isoenzimas nos gens, através de análise eletroforética.

Pelos dados apresentados na Tabela 2, verifica-se que a população da espécie *Deois flavopicta* no decorrer dos 2 anos de coleta, sempre foi superior ao nível de infestação observado para a espécie *L. entneriana*. Observa-se ainda, que os maiores níveis populacionais ocorreram nos meses de dezembro e janeiro, nos 2 anos de estudos, coincidindo com o período de maior precipitação pluviométrica, enquanto que a diminuição dos níveis de infestação das duas espécies chegou ser nula nos meses de maio a setembro.

A precipitação foi provavelmente um fator limitante na ocorrência das cigarrinhas. Assim, pelas observações da Tabela 2 e Figura 3, nota-se que a população de adultos esteve presente durante 7 meses do ano, ou seja, de outubro a abril. Resultados estes que coincidiram com a média de várias regiões do Estado de Minas Gerais, obtidas por REIS *et alii* (1978; 1980), com os dados publicados por MILANEZ (1980) para duas regiões do Estado de São Paulo, sendo também semelhante aos dados encontrados por SILVEIRA MELO (1982), na região de Campo Belo, Estado de Minas Gerais.

Tabela 2 - Número de exemplares adultos de cigarrinhas-das-pastagens *Deois flavopicta* e *Zulia entre-riana*, coletado com rede entomológica, na região de Rondonópolis, MT, no período de dezembro de 1983 a abril de 1985.

Espécies	1983												1984												1985			
	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr											
<i>Deois flavo-</i> <i>picta</i>	1423	4792	509	113	38	0	0	0	0	0	606	705	1561	5685	258	93	26											
<i>Zulia entre-</i> <i>riana</i>	907	934	103	56	21	0	0	0	0	0	119	171	886	915	70	42	18											
TOTAIS	2330	5726	612	169	59	0	0	0	0	0	725	876	2447	6600	328	135	44

Figura 3 - Flutuação populacional de adultos de cigarrinhas-das-pastagens, na região de Rondonópolis, MT, 1983/85.

4.2. OCORRÊNCIA NATURAL DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* EM CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS

Os resultados da ocorrência natural do *M. anisopliae* em cigarrinhas são apresentados na Tabela 3 e Figura 4.

Como pode-se observar os períodos de maiores ocorrências do fungo foram de dezembro a janeiro para os 2 anos agrícolas em estudo. Período este que coincide com os maiores índices populacionais de cigarrinhas na região estudada.

Estes resultados são concordantes com os encontrados por COTTAS e RAMIRO (1980), no Pontal de Paranapanema, Estado de São Paulo, nos anos de 1977/78.

Observou-se também que de uma maneira geral, o fungo apresentou pequena incidência nos meses de baixa precipitação. Isso se deve a baixa quantidade de formas biológicas encontradas no campo, umidades reduzidas e menores índices de temperatura, fatores imprescindíveis para o hospedeiro e patógeno.

Tabela 3 - Total de formas biológicas e mortalidade natural de adultos e ninfas de *Deois flavopicta* e *Zulia entreriana* pelo fungo *Metahizium anisopliae* amostradas com quadro de madeira durante o período de dezembro de 1983 a abril de 1985.

Tratamento	A		B		C		D		E		Média Geral	
Meses	Total (*)	Fun-go	Total (*)	Fun-go	Total (*)	Fun-go	Total (*)	Fun-go	Total (*)	Fun-go	Total (*)	Fun-go
1983 Dezembro	141	19	299	38	238	39	265	25	243	39	237	32
Janeiro	98	36	57	20	99	25	143	30	87	16	97	25
Fevereiro	98	18	61	8	77	11	65	20	56	14	71	14
Março	52	1	38	2	51	3	34	5	42	2	43	3
Abril	5	2	3	2	9	5	3	2	3	0	5	3
Maio	1	1	0	0	5	4	3	3	2	2	3	3
Junho	6	4	5	4	4	1	1	1	2	1	4	2
Julho	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1	2	2
Agosto	2	2	1	1	0	0	4	3	1	1	2	2
1984 Setembro	150	3	111	1	121	2	96	4	115	0	119	3
Outubro	49	1	74	14	52	9	39	14	102	38	63	15
Novembro	89	12	91	3	135	1	77	6	93	7	97	6
Dezembro	224	16	186	12	221	27	158	20	216	26	201	18
1985 Janeiro	72	32	61	26	73	18	128	33	56	14	78	25
Fevereiro	73	10	51	5	85	17	41	6	54	9	61	9
Março	41	1	30	2	46	3	29	6	41	4	37	3
Abril	5	3	4	2	5	3	4	2	2	0	4	3

* Formas biológicas sadias + atacadas pelo fungo.

Figura 4 - Total de formas biológicas e mortalidade natural de adultos e ninfas de *Deois flavopicta* e *Zulia entveriana* pelo fungo *Metarhizium anisopliae* durante o período de dezembro de 1983 a abril de 1985.

4.3. CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae*

Os resultados obtidos, expressos pelas médias dos diâmetros das colônias de cada isolado, quando submetidos à temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, constam na Tabela 4. Os valores médios representando o número de conídios produzidos por essas colônias encontram-se na Tabela 5.

Pela comparação das médias pelo teste de Tukey observou-se que os isolados SPL-270, SPL-278, SPL-271 e SPL-275 apresentaram maior crescimento das colônias e os isolados SPL-278, SPL-275, SPL-276 e SPL-279 apresentaram maior produção de conídios. Mediante a análise desses resultados constatou-se que o tamanho das colônias não está diretamente relacionado com a produção de conídios, uma vez que dos isolados que apresentaram maiores diâmetros de colônias apenas 2 deles destacaram-se na produção de conídios (Tabelas 4 e 5).

Os isolados PL-43, SPL-286, SPL-272, SPL - 279, SPL-277 e PL-27 foram os que apresentaram menor desenvolvimento das colônias. Por sua vez os isolados SPL-274, SPL - 273 e SPL-276 formaram um grupo intermediário quanto ao crescimento das colônias.

Considerando a capacidade de produção de conídios, observou-se que os isolados PL-27, SPL-270, SPL-271, SPL-286 e PL-43 mostraram-se menos produtivos e não diferiram estatisticamente ao nível de 5%, e os isolados SPL-277, SPL - 273,

SPL-274, SPL-272, formaram um grupo intermediário.

Tabela 4 - Diâmetro médio das colônias (mm) dos 13 isolados de *Metarhizium anisopliae*, após 6 dias de desenvolvimento em BDA a $26 \pm 5^\circ\text{C}$ e fo to período de 16 horas com os respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade.

Isolados	Repetições					Média
	1	2	3	4	5	
PL-27	20	19	20	19	19	19,40 d
PL-43	21	20	20	20	20	20,20 cd
SPL-286	20	19	20	21	21	20,20 cd
SPL-270	23	23	22	22	22	22,40 a
SPL-271	22	21	23	21	22	21,80 ab
SPL-272	20	20	21	20	20	20,20 cd
SPL-273	21	20	21	20	21	20,60 bcd
SPL-274	22	20	21	20	21	20,80 bc
SPL-275	22	21	23	21	22	21,80 ab
SPL-276	20	21	20	21	21	20,60 bcd
SPL-277	20	20	19	19	20	19,60 cd
SPL-278	22	22	23	22	23	22,40 a
SPL-279	20	20	20	20	20	20,00 cd

F. trat. = 13,34**

C.V. = 2,98%

D.M.S. = 1,36

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias seguidas das mesmas letras, não diferem estatisticamente.

Tabela 5 - Valores médios do número de conídios $\times 10^7$, isolados de *Metarhizium anisopliae*, após 6 dias de desenvolvimento em BDA a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, com os respectivos teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Isolados	Repetições					Média transformada $\sqrt{x + 0,5}$	
	1	2	3	4	5		
PL-27	9,15	8,87	11,01	9,93	9,26	3,18	efg
PL-43	4,02	4,22	3,25	4,45	7,72	2,26	i
SPL-286	7,80	5,90	5,40	6,01	3,40	2,47	hi
SPL-270	8,40	7,10	8,30	8,60	7,50	2,91	fgh
SPL-271	5,40	8,60	7,35	8,32	6,31	2,76	ghi
SPL-272	10,20	9,00	12,40	11,20	13,30	3,41	def
SPL-273	13,30	13,60	12,70	13,90	13,40	3,72	bcde
SPL-274	11,70	12,40	11,90	12,80	11,50	3,54	cde
SPL-275	24,60	21,50	18,40	16,80	18,10	4,50	a
SPL-276	13,90	18,50	15,20	19,40	20,80	4,24	ab
SPL-277	21,10	12,20	12,60	12,50	12,70	3,81	bcd
SPL-278	19,10	22,40	21,20	18,30	21,50	4,58	a
SPL-279	14,40	15,00	14,70	17,90	16,20	4,01	abc

F. trat. = 39,62**

C.V. = 7,59%

D.M.S. = 0,58

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

4.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS DE 13 ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae*

As características culturais dos diferentes isolados de *M. anisopliae* que se desenvolveram sob a temperatura de $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Descrição das colônias dos diferentes isolados de *M. anisopliae* que se desenvolveram a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Isolados	Características morfológicas das colônias	Padrão
PL-27	rasa com esporulação normal	B*
PL-43	rasa com esporulação central	A*
SPL-286	rasa com esporulação normal	A*
SPL-270	rasa com esporulação normal	B
SPL-271	rasa com esporulação esparsa	A
SPL-272	rasa com esporulação normal	B
SPL-273	rasa com esporulação normal	B
SPL-274	rasa com esporulação normal	B
SPL-275	rasa com esporulação normal	B
SPL-276	rasa com esporulação normal	B
SPL-277	rasa com esporulação normal	B
SPL-278	rasa com esporulação normal	B
SPL-279	rasa com esporulação normal	B

* padrão eletroforético constatado.

Pode-se observar que os isolados PL-43 e SPL-271 apresentaram colônias morfológicamente diferente dos demais isolados, tendendo às características do Padrão A, segundo ALVES *et alii* (1983) e os outros com características do Padrão B, semelhantes, portanto, ao isolado PL-27 (Padrão B). Portanto, 90% dos isolados provenientes de cigarrinhas-das-pastagens apresentaram características semelhantes ao Padrão B. Por outro lado, SOSA GÓMEZ (1983) e ALVES *et alii* (1983), verificaram que a maioria dos isolados provenientes de *M. posticata* pertenciam ao Padrão A.

4.5. DIMENSÕES DOS CONÍDIOS DOS 13 ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae*

As dimensões médias dos conídios dos 13 isolados estudados e respectivas análises de variância encontram-se na Tabela 7.

Verificou-se através dos resultados do teste de Tukey que os isolados apresentaram 2 categorias de médias de comprimento de conídios.

Os isolados que apresentaram maior comprimento em ordem decrescente foram: PL-27, PL-43, SPL-274, SPL-272, SPL-286, SPL-279, SPL-273, SPL-277, embora as médias destes 7 últimos não sejam diferentes estatisticamente; por outro lado os isolados SPL-270 e SPL-275 foram os que apresentaram menor com

Tabela 7 - Média do comprimento e largura de 50 conídios (micrômetros) dos diferentes isolados de *M. anisopliae* desenvolvidos em meio de BDA.

Isolados	Dimensão dos conídios			Tukey 5%
	Comprimento (micrôme- tros)	Tukey 5%	Largura (micrôme- tros)	
PL-27	6,93	a	2,09	j
PL-43	6,70	ab	2,10	i
SPL-286	6,57	ab	2,18	g
SPL-270	5,72	c	2,51	b
SPL-271	6,20	c	2,44	c
SPL-272	6,60	ab	2,15	h
SPL-273	6,40	ab	2,25	ef
SPL-274	6,60	ab	2,24	ef
SPL-275	5,67	c	2,57	a
SPL-276	6,27	bc	2,42	e
SPL-277	6,40	ab	2,27	e
SPL-278	6,25	bc	2,31	d
SPL-279	6,55	ab	2,23	f
F. tratamentos	7,39		685,45**	
C.V.	14,68%		1,78%	
D.M.S.	0,24		0,01	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

primento de conídios.

Pela Tabela 7, verificou-se através dos resultados do teste de Tukey que os 13 isolados apresentaram 10 categorias de médias de largura de conídios. Os isolados que apresentaram a maior largura foram SPL-275 e SPL-270, respectivamente, os isolados SPL-279, SPL-286, SPL-279, PL-43 e PL-27 foram os que apresentaram menor largura de conídios em ordem decrescente. Os demais isolados reuniram num grupo intermediário. Todos os isolados pertencem, portanto, a variedade *anisopliae*, segundo TULLOCH (1976), porém, apenas esse parâmetro não é o suficiente para caracterizar variedades do fungo *M. anisopliae* como já foi demonstrado por SILVEIRA NETO *et alii* (1984).

4.6. EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE OS DIFERENTES ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae*

Os dados da porcentagem de viabilidade de conídios dos diferentes isolados de *M. anisopliae* submetidos a diversos tempos de exposição constam nas Tabelas 8 a 20.

Por esses dados observou-se que todos os isolados apresentaram uma diminuição gradativa da viabilidade, à medida que se aumentou o tempo de exposição à radiação ultravioleta.

Foram comparados os dados transformados da média da porcentagem de viabilidade dos isolados para cada tempo de exposição.

Tabela 8 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado PL-27, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	99,18	98,80	99,43	98,80	84,47	a
20	95,50	97,00	98,00	94,50	79,02	b
25	91,50	94,80	93,30	93,50	75,02	c
30	91,00	90,00	89,50	90,80	71,80	d
35	81,00	83,00	81,50	82,00	64,80	e
40	79,00	78,00	79,50	78,00	62,46	e
45	65,50	66,50	66,00	65,50	54,25	f
50	59,00	58,50	60,50	61,50	50,69	g
55	31,50	33,50	34,00	30,50	34,67	h
60	13,50	14,50	15,50	12,80	21,95	i
65	6,50	10,50	9,00	7,00	16,61	j
75	3,50	5,50	5,00	4,00	12,20	k
85	1,00	2,50	1,50	1,50	7,22	l

F - Tratamentos = 2.217,93**

C.V. = 2,33%

D.M.S. = 3,03

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 9 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-43, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados de análises estatísticas.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	99,00	97,00	98,50	97,50	82,03	a
20	95,50	97,50	95,50	97,50	79,32	a
25	91,00	89,00	90,50	91,50	72,06	b
30	85,00	87,50	86,50	85,50	68,14	c
35	80,50	78,50	79,50	79,50	63,08	d
40	76,00	74,00	74,50	76,50	60,17	e
45	50,20	53,50	53,00	52,80	46,36	f
50	39,00	41,00	39,50	41,50	39,37	g
55	23,50	24,50	25,00	22,00	29,15	h
60	12,50	10,00	11,50	11,00	19,58	i
65	4,50	5,50	5,00	5,50	13,07	j
75	3,50	4,00	2,50	3,50	10,55	j
85	0,50	1,50	1,00	0,50	5,22	k

F - tratamentos = 2.408,78**

C.V. = 2,48%

D.M.S. = 2,80

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: as médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 10 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-286, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	99,00	99,50	99,50	99,50	85,52	a
20	99,50	97,50	98,00	98,50	82,92	b
25	94,50	96,50	96,00	94,50	77,64	c
30	89,00	90,00	89,50	90,00	71,21	d
35	81,50	83,50	82,00	82,50	65,18	e
40	74,00	75,50	76,50	76,00	60,33	f
45	69,50	68,50	71,00	70,00	56,63	g
50	59,50	61,00	60,50	61,50	51,13	h
55	28,50	26,50	27,50	27,50	31,62	i
60	15,50	13,50	14,00	15,00	22,37	j
65	8,00	6,50	7,50	7,50	15,75	k
75	3,50	5,50	4,50	4,00	12,03	l
85	0,80	1,30	1,00	0,90	5,91	m

F - tratamentos = 3.358,74**

C.V. = 1,99%

D.M.S. = 2,44

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 11 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolados SPL-270, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	98,32	99,21	98,14	97,19	82,49	a
20	96,40	95,78	96,18	95,56	78,44	b
25	91,43	90,40	89,73	91,63	72,35	c
30	89,63	88,13	90,52	88,45	70,81	c
35	85,70	84,45	86,67	83,22	67,24	d
40	77,58	78,23	77,68	76,46	61,67	e
45	67,22	68,32	66,56	66,45	55,02	f
50	42,35	41,28	42,93	41,22	40,36	g
55	31,14	30,13	32,25	30,12	33,77	h
60	15,03	16,37	15,38	15,46	23,22	i
65	7,53	6,54	5,92	5,82	14,69	g
75	1,42	1,96	1,00	1,21	6,73	k
85	0,68	0,91	0,43	0,65	4,68	k

F - tratamentos = 3.753,50**

C.V. = 1,65%

D.M.S. = 2,21

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: as médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 12 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-271, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	98,36	97,47	99,15	98,28	82,66	a
20	96,37	95,68	96,71	96,08	78,78	b
25	94,28	94,71	93,82	95,18	76,44	c
30	91,73	90,53	91,23	91,56	72,81	d
35	86,63	86,92	85,22	87,43	68,49	e
40	76,31	77,92	78,26	79,21	61,98	f
45	64,38	65,27	65,41	66,95	54,03	g
50	61,23	62,23	60,35	59,46	51,25	h
55	27,14	28,35	29,17	26,31	31,78	i
60	13,45	12,16	11,19	11,29	20,27	g
65	4,28	3,14	2,96	3,22	10,60	k
75	1,53	1,21	1,00	1,12	6,31	l
85	0,78	0,59	0,44	0,58	4,43	l

F - tratamentos = 4.847,35**

C.V. = 1,50%

D.M.S. = 2,03

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: as médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 13 - Porcentagem de viabilidade de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-272, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	98,74	97,36	98,62	97,43	82,05	a
20	95,43	96,68	96,71	95,86	78,74	b
25	93,61	94,78	93,88	94,76	76,14	c
30	90,34	91,47	90,65	89,23	71,98	d
35	86,37	85,73	86,13	85,27	67,92	e
40	76,71	77,21	76,29	77,47	61,28	f
45	64,73	65,23	63,18	64,91	53,43	g
50	58,16	58,37	59,26	57,31	49,76	h
55	26,26	25,14	26,12	24,39	30,31	-i
60	12,16	13,41	10,92	11,67	20,29	j
65	5,13	6,86	5,56	4,34	13,48	k
75	2,37	3,63	3,29	2,76	10,98	l
85	1,16	1,00	1,21	1,00	5,99	m

F - tratamentos = 3.229,75**

C.V. = 2,02%

D.M.S. = 2,59

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 14 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-273, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\frac{\text{arc sen } \sqrt{x/100}}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	99,13	98,23	98,83	97,32	82,84	a
20	96,16	97,18	95,93	96,18	79,03	b
25	94,32	95,12	93,38	94,79	76,33	c
30	90,31	91,98	90,39	90,23	72,28	d
35	86,42	85,32	86,83	85,69	68,08	e
40	76,24	76,91	76,38	75,32	60,81	f
45	64,15	65,13	63,21	64,39	53,26	g
50	52,18	50,21	51,16	50,93	45,64	h
55	21,11	20,82	19,38	20,38	26,86	i
60	10,19	11,93	12,81	11,56	19,91	j
65	5,13	6,22	6,12	5,98	14,00	k
75	2,18	3,14	3,35	2,91	9,76	l
85	1,42	1,00	1,38	,124	6,43	m

F - Tratamentos = 5.352,97**

C.V. = 1,6%

D.M.S. = 2,03

** Significativo ao nível de probabilidade.

Tabela 15 - Porcentagem de viabilidade de conídios do *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-274, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	98,31	99,13	98,16	97,81	82,71	a
20	96,14	95,18	96,51	95,19	78,13	b
25	93,13	94,23	93,19	93,58	75,27	c
30	92,19	91,16	90,86	91,75	73,04	d
35	83,23	84,65	83,28	85,91	66,64	e
40	77,91	76,19	77,91	76,90	61,49	f
45	66,43	67,32	67,82	65,31	54,77	g
50	61,61	60,23	61,68	60,35	51,33	h
55	26,14	28,15	27,93	26,52	31,42	i
60	13,41	12,19	10,27	11,54	20,11	j
65	6,32	5,34	5,91	6,83	14,28	k
75	2,91	1,44	1,97	2,72	8,56	l
85	1,31	0,96	1,14	1,14	6,11	m

F - tratamentos = 4.910,07**

C.V. = 1,64%

D.M.S. = 2,10

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 16 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-275, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	98,76	99,14	98,63	98,35	83,54	a
20	94,31	96,63	96,92	97,14	78,94	b
25	94,61	93,38	94,18	94,91	76,16	c
30	91,19	90,35	91,23	91,52	72,61	d
35	84,63	83,81	85,91	83,18	66,73	e
40	79,35	76,42	77,14	76,13	61,52	f
45	67,13	66,23	67,91	66,12	54,85	g
50	58,18	60,31	61,93	60,34	50,88	h
55	22,37	21,54	20,19	21,39	27,53	i
60	9,41	10,58	9,83	8,31	18,09	j
65	3,14	4,13	2,91	1,98	9,96	k
75	1,62	1,31	0,96	1,00	6,31	l
85	0,87	0,65	0,43	0,48	4,47	m

F - tratamentos = 3.685,54**

C.V. = 1,77%

D.M.S. = 2,38

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 17 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-276, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\frac{\text{arc sen } \sqrt{x/100}}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	99,13	98,18	97,61	98,19	82,56	a
20	94,61	93,71	94,82	95,36	76,61	b
25	92,40	91,31	92,63	93,45	74,06	c
30	88,36	88,23	89,23	90,37	70,68	c
35	83,16	80,81	79,28	80,92	64,20	d
40	75,18	74,32	73,39	74,92	59,64	e
45	67,19	66,21	68,31	67,54	55,13	f
50	53,20	51,39	50,43	51,91	45,99	g
55	15,14	14,91	13,12	14,18	22,24	h
60	7,39	8,32	7,40	6,31	15,71	i
65	3,11	4,14	2,81	1,42	9,59	j
75	1,39	1,62	0,94	0,17	5,50	k
85	0,73	0,87	0,46	0,07	4,18	k

F - Tratamentos = 2.526,67**

C.V. = 2,24%

D.M.S. = 2,89

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 18 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-277, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\frac{\text{arc sen} \sqrt{x/100}}{}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	98,43	97,91	98,35	99,14	82,94	a
20	94,51	93,12	92,16	93,26	74,98	b
25	92,60	91,19	90,12	90,18	72,59	bc
30	88,63	89,10	87,61	87,43	69,91	c
35	83,41	84,39	83,22	82,92	66,02	d
40	75,39	76,93	74,92	74,13	60,23	e
45	33,14	34,12	33,25	31,18	35,01	f
50	13,19	11,97	12,19	10,16	20,13	g
55	7,61	6,13	6,43	4,09	14,17	h
60	3,18	2,32	1,23	1,15	7,88	i
65	1,15	1,19	0,72	0,32	5,13	ij
75	0,95	0,93	0,39	0,08	4,08	j
85	0,49	0,47	0,17	0,11	3,19	j

F - tratamentos = 2.720,53**

C.V. = 2,69%

D.M.S. = 3,11

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 19 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-278, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	98,36	99,14	98,35	98,62	83,29	a
20	94,32	93,38	94,61	95,31	76,34	b
25	91,47	90,71	92,39	92,97	73,47	c
30	88,74	87,62	88,61	87,91	69,93	d
35	83,23	82,41	83,16	81,13	65,26	e
40	75,36	75,11	76,19	75,14	60,30	f
45	31,92	30,17	31,30	29,51	33,66	g
50	9,14	8,19	9,73	10,63	17,85	h
55	5,36	3,48	6,24	5,46	13,02	i
60	2,34	1,39	2,49	3,19	8,73	j
65	1,13	0,43	1,15	1,63	5,77	k
75	0,55	0,19	0,56	0,85	4,20	k
85	0,21	0,08	0,23	0,38	2,72	k

F - tratamentos = 3.932,34**

C.V. = 2,03%

D.M.S. = 2,49

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 20 - Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-279, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Tempos de exposição	Repetição				Média transfor- mada em $\frac{\text{arc sen} \sqrt{x/100}}$	Tukey 5%
	I	II	III	IV		
15	99,31	98,76	98,32	97,49	83,06	a
20	93,14	92,15	93,72	91,62	74,30	b
25	88,76	89,17	90,31	89,36	71,00	c
30	85,16	86,43	87,20	86,72	68,34	c
35	78,39	79,34	78,29	77,26	62,25	d
40	64,65	65,39	65,13	64,12	53,62	e
45	25,16	26,91	25,09	27,18	30,71	f
50	10,19	11,38	10,72	11,78	19,37	g
55	6,32	6,86	5,41	5,89	14,30	h
60	1,37	1,72	2,15	0,96	7,07	i
65	0,81	0,56	1,87	0,11	4,80	i
75	0,32	0,23	0,93	0,03	3,52	i
85	0,14	0,11	0,44	0,00	2,74	i

F - tratamentos = 3.146,01**

C.V. = 2,30%

D.M.S. = 2,74

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Na Tabela 21 encontram-se os dados referentes aos isolados dentro dos respectivos tempos de exposição.

Pode-se observar que o isolado SPL-286 foi o mais resistente e os isolados SPL-277 e SPL-279 foram os mais sensíveis quando submetidos ao tempo de 20 segundos de irradiação. Observando o tempo de 25 segundos de irradiação, verificou-se que não houve diferença entre os isolados e para o de 30 segundos, apenas o SPL-274, o mais sensível diferenciou dos demais isolados.

Para o tempo de 40 segundos de irradiação os isolados mais resistentes foram PL-27, SPL-272, SPL-271, SPL-270, SPL-275, SPL-274 e SPL-273; o isolado SPL-279 foi o mais sensível e os demais, formaram um grupo intermediário.

Considerando o tempo de 45 segundos de irradiação os isolados SPL-286, SPL-276, SPL-270, SPL-275, SPL - 274, PL-27 e SPL-271, foram os mais resistentes e os isolados SPL-277, SPL-278 e SPL-279 os mais sensíveis; os outros formaram um grupo intermediário.

Com o tempo de 50 segundos de irradiação observou-se maior resistência dos isolados SPL-274, SPL-271, SPL-286, SPL-275, PL-27 e SPL-272, e os isolados SPL-277, SPL-278 e SPL-279, foram os mais sensíveis.

Em relação ao tempo de 55 segundos, verificou-se maior resistência do isolado PL-27 e maior sensibilidade dos isolados SPL-279, SPL-277 e SPL-278.

Tabela 21 - Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$ da porcentagem de viabilidade de conídios dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, sob diferentes tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados do confronto das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Isolados	Tempo (segundos)											
	*	20	25	30	30	40	45	50	55	60	65	75
PL-27	*	79,02 ab	75,02 a	71,88 a	62,47 a	54,25 a	50,69 a	35,28 a	21,95 ab	16,61 a	12,20 a	
PL-43		79,32 ab	72,06 a	68,14 a	60,17 ab	46,36 b	39,37 b	29,16 abc	19,58 ab	15,07 a	10,47 ab	
SPL-286		82,92 a	77,65 a	71,21 a	60,33 ab	56,63 a	51,13 a	31,62 ab	22,37 ab	15,75 a	12,03 a	
SPL-270		78,44 ab	72,35 a	70,81 a	61,67 a	55,02 a	40,36 b	33,77 ab	23,22 a	14,63 a	6,73 abc	
SPL-271		78,78 ab	76,32 a	72,81 a	61,98 a	54,03 a	51,24 a	31,78 ab	20,27 ab	13,36 a	6,31 abc	
SPL-272		78,74 ab	76,14 a	72,05 a	62,33 a	53,44 ab	49,76 a	30,31 ab	20,29 ab	13,48 a	9,96 abc	
SPL-273		79,03 ab	76,33 a	53,89 a	60,81 a	53,26 ab	45,67 ab	26,86 bc	19,91 ab	14,00 a	9,76 abc	
SPL-274		78,14 ab	75,27 a	73,04 b	61,49 a	54,77 a	51,33 a	31,42 ab	20,11 ab	14,15 a	8,57 abc	
SPL-275		78,94 ab	76,16 a	72,62 a	61,52 a	54,81 a	50,88 a	27,53 bc	18,09 ab	9,96 ab	6,31 abc	
SPL-276		76,61 ab	74,06 a	70,68 a	59,64 ab	55,13 a	46,00 ab	22,24 c	15,72 bc	9,59 ab	5,50 abc	
SPL-277		74,98 b	72,59 a	69,91 a	60,23 ab	35,01 c	20,14 c	14,17 d	7,89 d	5,13 b	4,24 bc	
SPL-278		76,34 ab	73,28 a	69,93 a	60,30 ab	33,66 c	17,85 c	13,03 d	8,73 cd	5,84 b	4,08 bc	
SPL-279		74,30 b	71,00 a	68,14 a	53,62 b	30,71 c	19,38 c	14,31 d	7,08 d	4,80 b	3,13 c	

F - Tratamentos = 3.628,12

C.V. = 6,15

D.M.S. = 7,14

Obs.: as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

* as médias dos isolados não apresentaram diferenças significativas nos tempos 15, 35 e 85 segundos.

Analisando o tempo de 60 segundos, observou-se maior resistência do isolado SPL-270 em contraposição com a maior sensibilidade do SPL-277 e SPL-279.

No tempo de 65 segundos os isolados PL-27, SPL-286, SPL-270, SPL-274, SPL-273, SPL-272, SPL-271 e PL-43 foram os mais resistentes e os isolados SPL-278, SPL-277 e SPL-279 foram os mais sensíveis a irradiação.

Para o maior tempo de exposição (75 segundos) os isolados PL-27 e SPL-286 foram os mais resistentes enquanto que o SPL-279 foi o mais sensível.

Apesar de se ter trabalhado com isolados diferentes, esses dados concordam, de modo geral, com os obtidos por SOSA GOMEZ (1983) e ALMEIDA (1983) e pouco concordantes com os obtidos por MESSIAS (1979) e FRIGO (1984), uma vez que a metodologia utilizada por estes últimos, diferem da empregada pelos primeiros.

Na Tabela 22 acham-se os resultados da comparação da influência dos tempos de exposição sobre os isolados de um modo geral.

Por esses resultados observa-se que os isolados mais resistentes foram SPL-286, PL-27, SPL-271, SPL-272, SPL-274 e os mais suscetíveis SPL-277, SPL-278 e SPL-279, ficando os demais em um grupo intermediário.

Tabela 22 - Comparação das médias gerais de viabilidade dos isolados de *M. anisopliae* nos diferentes tempos de exposição à luz ultravioleta, com os respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade.

Isolados	Médias
PL-27	48,92 ab
PL-43	45,24 d
SPL-286	49,08 a
SPL-270	46,82 cd
SPL-271	47,89 abc
SPL-272	47,89 abc
SPL-273	45,89 d
SPL-274	47,98 abc
SPL-275	47,04 bcd
SPL-276	45,07 d
SPL-277	39,72 e
SPL-278	39,56 e
SPL-279	37,97 e

F. trat. = 81,79

C.V. = 6,65 %

D.M.S. = 1,98

Obs.: Na média das viabilidades estão incluídas as viabilidades obtidas em todos os tempos de exposição.

4.7. BIOENSAIO COM *Diatraea saccharalis*

Os resultados obtidos no bioensaio com *D. saccharalis*, expressos em porcentagens de mortalidade corrigida e acumulada, acham-se na Tabela 23.

Por estes resultados, observa-se que os isolados SPL-286, SPL-272, SPL-276 e SPL-278, foram mais virulentos para o inseto.

Os isolados SPL-270, SPL-271, SPL-272, SPL-273, SPL-274, SPL-275, SPL-277 e SPL-279, comportaram-se medianamente virulentos para *D. saccharalis*; enquanto que os isolados PL-27 e PL-43 mostraram pequena virulência; resultados estes concordantes com os encontrados por SOSA GÓMEZ (1983), no que se refere ao isolado PL-43.

Para o controle de cigarrinhas-das-pastagens, poderão ser utilizados os isolados SPL-272, SPL-276 e SPL-278, sendo desaconselhável o uso do SPL-286 que apesar de ter sido virulento, foi isolado de *Mahanarva posticata*, provenientes de Santa Catarina.

Tabela 23 - Porcentagens de mortalidade corrigida e acumulada de pré-pupas de *Diatraea saccharalis*, provocadas pelos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml.

Isolados	Dias após inoculação									
	4	5	6	7	8	9	10			
PL-27	13,3	56,6	63,3	60,0	60,0	-	-	-	-	-
PL-43	16,6	13,3	30,0	40,0	40,0	50,0	53,3			
SPL-286	36,6	86,6	70,0	100,0	-	-	-	-	-	-
SPL-270	53,3	76,6	80,0	76,6	80,0	-	-	-	-	-
SPL-271	16,6	43,3	53,3	73,3	86,6	90,0	93,3			
SPL-272	20,0	70,0	80,0	83,3	100,0	-	-	-	-	-
SPL-273	40,0	60,0	86,6	86,6	-	-	-	-	-	-
SPL-274	36,6	73,3	70,0	73,3	73,3	73,3	-	-	-	-
SPL-275	30,0	53,3	70,0	73,3	76,6	-	-	-	-	-
SPL-276	20,0	60,0	70,0	86,6	90,0	-	-	-	-	-
SPL-277	23,3	56,6	66,6	83,3	86,6	-	-	-	-	-
SPL-278	23,3	70,0	80,0	90,0	100,0	-	-	-	-	-
SPL-279	26,6	60,0	70,0	76,6	80,0	-	-	-	-	-

4.8. PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A comparação dos valores médios dos índices enzimicos, obtidos da relação diâmetro do halo produzido / diâmetro da colônia, encontram-se na Tabela 24 e Figura 5,

Como pode-se observar os isolados que apresentaram maior produção de amilase foram SPL-274, SPL-279, SPL - 270, SPL-276, SPL-275, SPL-271, SPL-272, SPL-273, SPL-277 e SPL-278. Os demais isolados localizaram-se num grupo com menor atividade amilolítica.

Em relação à capacidade de produção de protease os isolados mais produtivos foram SPL-277, SPL-271, SPL-270, SPL-278, SPL-275, SPL-279, SPL-273, SPL-272, SPL-274 e SPL-276.

Os demais isolados apresentaram baixa capacidade de produção proteolítica.

Considerando a capacidade de produção de lipase, os isolados que mostraram mais produtivos foram SPL-271, SPL-274, SPL-273, SPL-270, SPL-272, SPL-276, SPL-277, SPL-275, PL-27, SPL-279, SPL-278 e PL-43, não diferindo entre si ao nível de 5% de significância.

O isolado SPL-286 apresentou menor capacidade de produção dessa enzima, no entanto não apresentou diferença estatística dos isolados SPL-270, SPL-272, SPL-276, SPL-277, SPL-275, PL-27, SPL-279, SPL-278 e PL-43 componentes do grupo que mostrou maior produção de lipase.

Por esses resultados observa-se que de um modo

geral, os isolados SPL-271, SPL-272, SPL-276, SPL-278, apresentaram índices enzimicos razoavelmente elevados e maiores taxas de mortalidades (Tabela 24). Isso também foi constatado por SO SA GÓMEZ (1983) quando observou que os isolados mais virulentos apresentaram atividade lipolítica. Porém, isolados como SPL-270, SPL-274, SPL-275 e SPL-279 foram bons produtores de enzima e não foram altamente virulentos.

Tabela 24 - Contraste das médias, através do teste de Tukey (5%), dos índices enzimicos, para produção de amilase, protease e lipase obtidos após incubação a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 5 dias.

Isolados	Amilase	Tukey (5%)	Protease	Tukey (5%)	Lipase	Tukey (5%)
PL-27	0,4740	bc	0,7300	bc	0,6360	ab
PL-43	0,4700	c	0,7340	abc	0,5660	ab
SPL-286	0,5460	abc	0,6200	c	0,5000	b
SPL-270	0,6780	a	0,8940	ab	0,7000	ab
SPL-271	0,5760	abc	0,9040	a	0,7480	a
SPL-272	0,5360	abc	0,8220	ab	0,6840	ab
SPL-273	0,5720	abc	0,8420	ab	0,7200	a
SPL-274	0,6880	a	0,8040	ab	0,7300	a
SPL-275	0,6440	ab	0,8620	ab	0,6460	ab
SPL-276	0,6460	a	0,7940	ab	0,6620	ab
SPL-277	0,5700	abc	0,9060	a	0,6560	ab
SPL-278	0,5500	abc	0,8760	ab	0,6300	ab
SPL-279	0,6480	a	0,8500	ab	0,6340	ab
F. trat.	4,25		5,56		2,40	
C.V.	13,30%		9,61%		14,90%	
D.M.S.	0,17		0,17		0,21	

Obs.: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Amilase
Lipase
Protease

Figura 5 - Índices enzimicos para produção de amilase, lipase e protease, dos diferentes isolados, obtidos após incubação a $28 \pm 0,50^\circ\text{C}$, durante 5 dias e fotoperíodo de 16 horas.

4.9. UTILIZAÇÃO DO FUNGO *Metarhizum anisopliae* EM DIFERENTES DOSES PARA CONTROLE DE CIGARRINHAS

Os resultados de mortalidade de *D. flavopicta* e *Z. entrepiana* aos 8, 15 e 23 dias após o tratamento com o fungo *M. anisopliae* encontram-se na Tabela 25.

Na Tabela 26 acham-se os resultados da análise de variância referentes a esses dados e verifica-se que houve diferença de dia dentro de tratamentos, porém de uma maneira geral não houve diferença entre os dias de observação de mortalidade.

Os resultados das análises de cada dose são observados separadamente, na Tabela 27, confrontando dia dentro de cada tratamento.

A contagem realizada aos 23 dias apresentou maior mortalidade, quando foi avaliado dia dentro do tratamento (A), possivelmente em consequência da mortalidade natural do inseto devido ao seu ciclo biológico. Por outro lado, para dia dentro do tratamento (C), as mortalidades aos 8 e 15 dias foram maiores que aos 23 dias, resultados estes devido ao possível efeito da dose utilizada neste tratamento.

Porém, para dia dentro de tratamento (D), observou-se que houve diferença na mortalidade nos diferentes dias de contagem. Como era de se esperar ocorreu uma mortalidade muito grande aos 8 dias reduzindo aos 15 e 23 dias, devido ao efeito do fungo na maior dose utilizada no experimento.

Tabela 25 - Número de *Deois flavopicta* e *Zulia entreriana* mortas aos 8, 15 e 23 dias após tratamento com o fungo *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-272.

Tratamentos		Repetições					Média
		I	II	III	IV	V	
A (7,3 g/ha)	8 dias	9	6	10	5	10	8
	15 dias	10	5	8	4	6	7
	23 dias	22	18	28	19	25	22
B (681 g/ha)	8 dias	12	16	8	6	25	13
	15 dias	15	25	8	10	12	14
	23 dias	13	4	14	18	5	11
C (1000 g/ha)	8 dias	29	20	18	28	15	22
	15 dias	10	28	10	18	20	17
	23 dias	8	1	13	0	2	5
D (1363 g/ha)	8 dias	18	33	46	42	27	33
	15 dias	25	10	2	3	17	11
	23 dias	6	1	0	0	3	2
E (testemunha)	8 dias	2	3	4	6	1	3
	15 dias	8	6	8	9	4	7
	23 dias	18	14	20	16	21	18

Obs.: o número inicial de cigarrinhas por repetição = 50.

Tabela 26 - Resultados da análise de variância relativa aos dados de mortalidade de cigarrinhas.

Causas da variação	Análise de variância			
	G.L.	SQ	QM	F
Tratamento (Tr)	4	4,0627	1,014	2,83*
Resíduo (a)	925	0,198		
Parcelas	24	10,0453		
Dia (Di)	2	5,3278	2,6639	3,04 NS
Interação (Tr x Di)	8	90,9002	11,3625	12,96**
Resíduo (b)	40	35,0727	0,8768	
TOTAL	74	141,3462		
Dia dentro Trat. A	2	13,5894	6,7947	7,75**
Dia dentro Trat. B	2	0,6458	0,3229	0,37 NS
Dia dentro Trat. C	2	19,9995	9,9997	11,40**
Dia dentro Trat. D	2	47,2103	23,6051	26,92**
Dia dentro Trat. E	2	14,7832	7,3916	8,43**
Trat. dentro 8 dias	4	45,7093	11,4273	16,70**
Trat. dentro 15 dias	4	8,3626	2,0907	3,06*
Trat. dentro 23 dias	4	40,8911	10,2228	14,94**

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

NS não significativo

C.V. (parcela) = 16%

C.V. (subparcela) = 27,5%

Tabela 27 - Médias referentes as mortalidades de *Deois flavopicta* Zulia *entreveriana* aos 8, 15 e 23 dias após tratamento com o fungo *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-272, com seus respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade (interação dias dentro dos tratamentos).

Tempo	Dosagens			
	A	C	D	E
8 dias	2,89 b	4,70 a	5,73 a	1,87 b
15 dias	2,63 b	4,13 a	3,18 b	2,71 b
23 dias	4,77 a	2,02 b	1,41 c	4,26 a
F. trat.	7,75**	11,40**	26,92**	8,43**
C.V. = 16,1%				
D.M.S. = 1,44				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs.: As médias foram transformadas em $\sqrt{x + 0,5}$, analisadas em colunas e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Ao apreciar o efeito de dia dentro do tratamento (E) (testemunha), verificou-se que a mortalidade maior foi aos 23 dias, resultado este considerado normal devido a ocorrência da mortalidade natural da população.

Analogamente foi determinada a interação dos tratamentos dentro dos dias de observações conforme pode ser observado na Tabela 28.

Tabela 28 - Médias referentes as mortalidades de *Deois flavopicta* e *Zulia entreriana* aos 8, 15 e 23 dias após tratamento com o fungo *Metarhizium anisopliae*, isolado SPL-272, com seus respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade (interação tratamentos dentro dos dias).

Doses	Tempo		
	8 dias	15 dias	23 dias
A	2,89 cd	2,63 b	4,77 a
B	3,62 bc	3,73 ab	3,25 bc
C	4,70 ab	4,13 a	2,02 cd
D	5,73 a	3,18 ab	1,41 d
E	1,86 d	2,71 ab	4,26 ab
F. trat.	16,70**	3,06*	14,94**
C.V. = 16,1%			
D.M.S. = 1,48			

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Obs.: As médias foram transformadas em $\sqrt{x + 0,5}$, analisadas em colunas e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

No 8º dia observou-se que a maior dosagem (tratamento D) foi diferente da testemunha e dos tratamentos (A) e (B); porém o tratamento (C) foi igual ao (D). Já para o 15º dia verificou-se que o tratamento (C) foi diferente do (A) e seme-

lhante aos demais. Assim pode-se dizer que não é interessante efetuar avaliações de mortalidade de cigarrinhas quando decorridos 15 dias da aplicação, já que há uma tendência das mortalidades se igualarem à testemunha. Por outro lado, dentro de 23 dias observou-se que o tratamento (A) foi igual ao (E) (testemunha), mas diferente dos demais, e que (C) e (D) não foram semelhantes à testemunha.

Através dos resultados obtidos observou-se que quando se espera 23 dias para efetuar a contagem, há uma tendência das dosagens baixas igualarem-se a testemunha, devido a mortalidade natural dos adultos.

4.9.1. Mortalidade de ninfas

Os resultados referentes a porcentagens de mortalidade de ninfas encontram-se na Tabela 29 e Figura 6.

Por esses dados observou-se que as dosagens (C) e (D) diferiram da testemunha, ao passo que as doses (A) e (B) não.

Com isso, pode-se dizer que para o controle de ninfas há necessidade da utilização de doses elevadas do patógeno, já que a dose de 1360 g de conídios eliminou cerca de 37,27% das ninfas. As doses comumente empregadas estão entre 10^{10} e 10^{12} conídios/ha, podendo ser consideradas como subdoses do patógeno (ALVES, 1984).

Tabela 29 - Médias da porcentagem de ninfas mortas e esporuladas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* após 8 dias de aplicação.

Tratamentos	Médias
A	25,17 ab
B	19,70 ab
C	34,54 a
D	37,27 a
E	8,57 b

F. trat. = 3,76

C.V. = 53,4%

D.M.S. = 23,72

Obs.: As médias foram transformadas em $\sqrt{x + 0,5}$, e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

Figura 6 - Porcentagem de ninfas mortas e esporuladas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* após 8 dias de aplicação.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos diferentes experimentos com o fungo *Metarhizium anisopliae* relatados no presente trabalho, pode-se concluir que:

1. As espécies de cigarrinhas-das-pastagens predominantes na região são *Deois flavopicta* e *Zulia entreciana*.
2. Os maiores fluxos populacionais de cigarrinhas e os maiores índices de doença provocada por *M. anisopliae* ocorre no período de dezembro a janeiro.
3. Todos os isolados do *M. anisopliae* pertencem à variedade *a-nisopliae* (=minor).

4. Os isolados que apresentam maior crescimento de colônias, em ordem decrescente são: SPL-270, SPL-278, SPL-271 e SPL-275. Entretanto, os isolados SPL-278, SPL-275, SPL-276 e SPL-279 apresentam maior produção de conídios.
5. Os isolados que apresentam maior comprimento de conídios por ordem decrescente são: PL-27, PL-43, SPL-274, SPL-272, SPL-286, SPL-279, SPL-273 e SPL-277. Por outro lado, os isolados SPL-270 e SPL-275 são os que possuem menor tamanho de conídios.
6. Os isolados que apresentam maior resistência natural à radiação ultravioleta são PL-27 e SPL-286, enquanto que o isolado 279 apresenta maior sensibilidade a esse fator.
7. Os isolados mais virulentos para *D. saccharalis* são: SPL-286, SPL-272, SPL-276 e SPL-278.
8. Os isolados SPL-274, SPL-270, SPL-279 e SPL-276, apresentam maiores índices de amilase, enquanto que os isolados SPL-277 e SPL-271 apresentam maiores índices de protease e os isolados SPL-271, SPL-274 e SPL-273 são os maiores produtores de lipase.
9. As doses mais eficientes do *M. anisopliae* em condições de campo são 1.000 g/ha ($1,1 \times 10^{13}$ con./ha) e 1.363 g/ha ($1,5 \times 10^{13}$ con./ha).

10. O melhor tempo para avaliação de mortalidade de cigarri-
nha submetida ao controle microbiano foi de 8 dias após a
aplicação do fungo.

6. LITERATURA CITADA

ALMEIDA, L.C. de, 1983. Efeito das radiações gama e ultravioleta em isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., 1883 e sua utilização visando o controle da *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794). Piracicaba, ESALQ/USP, 109p. [Dissertação de Mestrado].

ALMEIDA, L.C. e S.B. ALVES, 1982. Testes preliminares de dosagens do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., para o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 99(2): 35-38.

ALVES, S.B., 1980. Alguns fatores que afetam o controle microbiano de insetos. In: V Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, Itajaí-SC, p.215-264.

- ALVES, S.B., 1982. Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, ESALQ/USP, 95p. [Tese de Livre-Docência].
- ALVES, S.B., 1984. Controle biológico de pragas de pastagens. Anais do 7º Simpósio sobre Manejo de Pragas da Pastagem. FEALQ, Piracicaba, p.169-208.
- ALVES, S.B.; L.C. FORTI e F.J. CIVIDANES, 1980 . Influence of light color on some biological activities *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. an entomopathogenic fungus. Revista Brasileira de Entomologia. São Paulo, 24(2): 123-125.
- ALVES, S.B.; S.H. RISCO B. e L.C. ALMEIDA, 1982. Evaluation of spore amounts of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. produced per hectare during the epizootic phase of the disease on sugarcane leafhopper, *Mahanarva posticata*. Entomology Newsletter. Araras, IAA/PLANALSUCAR, (13): 7.
- ALVES, S.B.; R. MACHADO NETO; N. MACEDO e L.C. ALMEIDA, 1983. Widespread occurrence of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Standard A) on *Mahanarva posticata* (Stal) in Brazil. Entomology Newsletter. Araras, IAA/PLANALSUCAR, 15: 6-7.

- AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomôgeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no Estado de Pernambuco. Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas. Recife, 72: 1-26.
- BALFOUR-BROWNE, F.L., 1960. The green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. Proceedings of Royal Entomological Society of London, Ser. A, London, 35: 65-74.
- BARNETT, H.L.; 1960. Illustrated genera of imperfecti fungi. Minneapolis Burgess Publishing Company, 225p.
- BARON, G., 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, The Willians & Wilins Company, 686p.
- BONA, A. de; N. SUPLICY Fº; R. CALZA; E. AMANTE e H.J. SARTINI, Observações ecológicas das cigarrinhas dos pastos, *Tomasopsis flavopicta* e *Monecphora entheriana*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Defensivos para a Lavoura e Pecuária, 1., 1967. São Paulo, 1967. Anais. São Paulo.
- COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of Fungi. New York, J. Wiley & Sons, Inc. 524p.

CONTI, E.; C.L. MESSIAS; H.M.L. SOUZA e J.L. AZEVEDO, 1980.

Eletrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. Experientia. Schwetz, 36: 293-294.

CORRÊA, G.S., 1982. Influência da radiação ultravioleta na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no solo. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico. Brasília, 3: 8-9.

COSENZA, G.W., 1984. Controle de cigarrinhas-das-pastagens. Suplemento Agrícola de "O Estado de São Paulo". São Paulo, p.12.

COTTAS, M.P. e Z.A. RAMIRO, 1980. Flutuação populacional de cigarrinhas (Hom. Cercopidae) em duas variedades de *Brachiaria*, na região do Pontal do Paranapanema, Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 6, Campinas. Resumos. p.129.

CRUZ Jr., F.G. da; C.A. da CRUZ e A.M. de OLIVEIRA, 1980. Levantamento de cigarrinhas das pastagens em Pinheiral, Município de Piraí, Estado do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 6, Campinas. Resumos, p.130.

- DAOUST, A. e D.W. ROBERTS, 1982. Virulence of natural and insect-passaged strains of *M. anisopliae* to mosquito larval. Journal of Invertebrate Pathology, 40: 107-117.
- DeBACH, P., 1968. Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. 2.ed. México, D.F. Campaña Editorial Continental S/A, 949p.
- DOMINGUES, J.M. e E.M.S. SANTOS, 1975. Estudo da biologia da cigarrinha das pastagens, *Zulia entreciana* (Berg., 1879), e sua curva populacional no Norte do Estado de Espírito Santo. Boletim Técnico da EMCAPA, Vitória, (2): 36.
- EL-KADI, M.K., 1978. Flutuação populacional de cigarrinhas das pastagens no Estado de São Paulo. In: Congresso Latinoamericano de Entomologia, 3, Congresso Brasileiro de Entomologia, 5, 1978. Ilhéus/Itabuna, 1978. Resumos. Ilhéus/Itabuna, Sociedade Entomológica do Brasil.
- FARGUES, J.; T. DURIEZ; J. ANDRIEU; R. POPEYE e P. ROBERT, 1975. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (Delacr.) sien champignon hyphomycète entomopathogène. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Ser. D., 281: 1781-1784.

- FERRON, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology. Palo Alto, 23: 409-442.
- FLORES, F.J.D., 1975. Daños causados por adultos de mosca pinta *Aeneolamia postica* (Wlk) a diversas espécies de zacates forrageiros. Folia Entomologia Mexicana. México, (28): 71-75.
- FRIGO, S.M., 1983. Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 116p. [Tese de Doutorado].
- GABRIEL, B.P., 1968. Enzymatic activities of some entomophthorous fungi. Journal invertebrate Pathology. New York, 11: 70-81.
- GUAGLIUMI, P.; E.J. MARQUES e A.M. VILAS BOAS, 1974. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. Recife, CODECAP, 54p. [Boletim Técnico, 3].
- HAMMIL, T.M., 1972. Electron microscopy of phialoconidogenesis in *Metarhizium anisopliae*. American Journal of Botany, 59: 317-326.

- HANKIN, L.; S.L. ANAGNOSTAKIS, 1957. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. Bronx, 67: 597-607.
- HUBER, J., 1958. Untersuchungen zur physiologic insektentender pilze. Archiv fur Mikrobiologie, 29: 257-276. Apud: MADELIN, M.F., 1968. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogenous fungi. In: The fungi. AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN, eds., 3: 227-238. New York, Academic Press.
- IGNOFFO, C.M.; D.L. HOSTETTER; P.P. SIKOROWSKI; G. SUTTER e W.M. BROOKS, 1977. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. Environmental Entomology, 6(3): 411-415.
- KENDRIK, W.B., 1971. Taxonomy of fungi imperfecti. University of Toronto Press. 390p.
- LATCH, G.C.M., 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. New Zealand Journal of Agricultural Research. Wellington, 8: 384-396.

- LIHNELL, D., 1944. Gronmykos Fororsakeo an *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Fisiologiskā Undersokningar over gronmykosens svamps. Stat. Vaxtskyodsant. Stockolm meddel, 43: 59-90.
- MACEDO, N.; A.C. MENDES; P.S.M. BOTELHO e J.A. MAGRO, 1977. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarrinha da raiz (*Mahanarva fimbriolata* Stal) na cultura da cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 90(2): 16-19.
- MARCHIONATTO, J.B., 1942. Nota sobre la "muscardina verde", *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Revista Chilena de Historia Natural, 1942-1943: 12-14.
- MARQUES, E.J., 1981. A cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) (Hom.: Cercopidae) fator limitante na produção de açúcar no Nordeste do Brasil. In: VI Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, João Pessoa, PB, p.187-198.
- MARTIGNONI, M.E., 1968. Producción masiva de patógenos de insectos. In: DeBACH, P. Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México DF, Editora Continental, p.949.
- MATAMI, B.A. e J.L. LIBBY, 1975. Scanning electron microscopy of *Entomophthora virulenta* and *Conidiobolus coronatus*. Journal of Invertebrate Pathology, 26: 165-170.

- MELO, L.A. da S.; P.R. REIS; W. BOTELHO e L.A. da C. GAEIRAS, 1980. Levantamento e distribuição das espécies de cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera-Cercopidae), no Estado de Minas Gerais, 1974/78. Projeto Bovinos - Cigarrinhas das Pastagens; relatório 1974/79. EPAMIG, Belo Horizonte, p. 36-41.
- MENDES, A.C.; P.S.M. BOTELHO; N. DEGASPARI e S.M.S.S. ARAÚJO, 1980. Desenvolvimento do combate biológico da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.:Pyralidae), na Coordenadoria Regional Sul, importância, resultados e perspectivas futuras. In: V Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR. Itajaí, SC, 14-19 de abril.
- MESSIAS, C.L., 1979. Parasexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, SP, 73p. [Tese de Doutorado].
- MESSIAS, C.L.; D.W. ROBERTS e A.T. GREFIG, 1983. Pyrolysis - gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: and aid to strain identification. Journal of Invertebrate Pathology, 42: 393-396.
- MESSIAS, C.L. e J.L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society. Cambridge, 75(3): 473-477.

- MESSIAS, C.L. e J.L. AZEVEDO, 1981. Caracterização e separação de linhagens haplóides e diplóides de *Metarhizium anisopliae*. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 7, Fortaleza. Resumos, p.117.
- MESSIAS, C.L.; J.L. AZEVEDO; E. de CONTI e H.M.L. SOUZA, 1978. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarhizium anisopliae*. In: 3º Congresso Latinoamericano de Entomologia, e 5º Congresso Brasileiro de Entomologia, Ilhéus-Itabuna. Anais.
- MILANEZ, J.M., 1980. Dinâmica populacional de *Zulia* (*Notozulia*) *entreriana* (Berg., 1879) e *Deois* (*Acanthodeois*) *flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera - Cercopidae) em diferentes gramíneas. Piracicaba, ESALQ/USP, 79p. [Dissertação de Mestrado].
- MORA, D.J. e E.M. da S. SANTOS, 1975. Estudo da biologia da cigarrinha das pastagens *Zulia entreriana* (Berg., 1879) e sua curva populacional no Norte do Estado do Espírito Santo. Boletim Técnico, 2, EMCAPA, Vitória, 36 p. [7 Fig.].
- MOURA COSTA, M.D. e C.D. MAGALHÃES, 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., parasito da "cigarrinha" das pastagens. Boletim do Instituto Biológico da Bahia, 13: 57-60.

NAKANO, O.; S. SILVEIRA NETO; R.A. ZUCCHI, 1981. Entomologia Econômica. São Paulo, Livroceres, 314p.

OCHOA, R. e P.H. VELASCO, 1972. Influência de la quema de un pastizal sobre población de mosca pinta e, otros insectos y rendimiento de la pradera. Informe Técnico, INTA, México, p.65-7.

OLIVEIRA, D.P., 1979. Sobrevivência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em rizosfera de gramíneas forrageiras. Viçosa, U.V.V., 54p. [Dissertação de Mestrado].

OLIVEIRA, M.A.S. e W.J. CURI, 1980. Flutuação populacional da cigarrinha das pastagens e teste de patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinhas. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 6, Campinas. Resumos, p.133.

OOMEN, P.A., 1975. A population study of the spittle bugs *Aeneolamia occidentalis* (Walk.) and *Prosapia simulans* (Walk.) (Homoptera: Cercopidae) in Mexican Pangola pastures. Z. Ang. Ent., 79: 225-238.

PACHECO, J.M. e M.G. BERNARDES, 1976. Ensaio de campo com o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., em três concentrações de esporos, visando o controle microbiano das "cigarrinhas das pastagens" *Zulia entrexiana* Berg., no norte do Estado do Espírito Santo, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 3, Maceió. Resumos, p.20.

- PERONDINI, A.L.P.; L. MORI e J.S. MORGANTE, 1979. Variações cromáticas das asas em duas espécies de cigarrinhas de pastagens. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, 14(4): 303-310.
- PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions British Mycological Society, 16: 55-75.
- RAMOS, I.M., 1976. Biologia da cigarrinha das pastagens *Zulia entneriana* (Berg., 1879) (Homoptera: Cercopidae). Piracicaba, ESALQ/USP, 72p. [Dissertação de Mestrado].
- RATAULT, C. e A. VEY, 1977. Production d'esterases et de N-acetylc glucosaminidase dans le tegument du Coléoptère *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Entomophaga, 22(3): 289-294.
- REIS, P.R.; L.A. da S. MELO; L.A. da C. GAEIRAS e W. BOTELHO, 1978. Flutuação populacional das cigarrinhas das pastagens (Hom.: Cercopidae) no Estado de Minas Gerais. Identificação das espécies e área de distribuição. In: Congresso Latinoamericano de Entomologia, 3, e Congresso Brasileiro de Entomologia, 5, 1978. Ilhéus/Itabuna. Resumos. Sociedade Brasileira de Entomologia.
- REIS, P.R.; L.A. da S. MELO; L.A. da C. GAEIRAS e W. BOTELHO; 1980. Flutuação populacional das cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera-Cercopidae) e condições climáticas que influenciam sua ocorrência. Projeto Bovinos - Cigarrinhas das Pastagens; relatório 1974/79, EPAMIG, Belo Horizonte, p.60-93.

- ROCKWOOD, L.P., 1950. Entomogenous fungi of the genus *Metarhizium* on wireworms in the Pacific Northwest. Annals Entomological Society of America, 43(4): 495-498.
- ROSATO, Y.B.; C.L. MESSIAS e J.L. AZEVEDO, 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 38(1): 1-3.
- SANTOS, A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, ESALQ/USP, 148p. [Dissertação de Mestrado].
- SILVA, A.B. e B.F. MAGALHÃES, 1980. Controle de cigarrinhas das pastagens *Deois incompleta* Walk. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 6, Campinas. Resumos, p.122.
- SILVEIRA NETO, S.; S.B. ALVES; M.L. HADDAD e D. SOSA GÓMEZ, 1984. Uso da análise de agrupamento na separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 9, Londrina. Resumos, p.168.
- SILVEIRA MELO, L.A. da, 1982. Estudo populacional das cigarrinhas das pastagens (Hom.: Cercopidae) sobre *Brachiaria decumbens* Stapf na região de Campo Belo, MG. Piracicaba, ESALQ/USP, 68p. [Dissertação de Mestrado].

- SOSA GÓMEZ, D.R., 1983. Caracterização e padronização de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 provenientes de diferentes regiões do Brasil. Piracicaba, ESALQ/USP, 117p. [Dissertação de Mestrado].
- SOSA GÓMEZ, D.R. e ALVES, S.B., 1983. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. 1. Estandarización, virulência y actividad enzimática. CIAPRON, Rev. Invest., 1(3): 83-102.
- SOSA GÓMEZ, D.R.; S.B. ALVES e R. MACHADO NETO, 1984. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. III. Inactivación de conidios con luz ultravioleta y zimogramas del sistema de alfa-esterasas. CIRPON, Rev. Invest., 2(1-2): 47-54/1984.
- SOUZA, H.M.F., 1976. Algumas considerações sobre os dados climáticos e os surtos da cigarrinha das pastagens *Zulia entreariana* (Berg.) e *Aeneolamia selecta* (Wlker); no período de 1973 a 1975. Boletim do Instituto Biológico da Bahia. Salvador, 115(1): 110-116.
- STEINHAUS, E.A., 1949. Principles of insect pathology. McGraw Hill Publications in the Agricultural Sciences. R.A. BRINK, Consulting Editor. 757p.

- TINLINE, R.D. e C. NOVIELLO, 1971. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. Mycologia. New York, 63: 701-712.
- TULLOCH, N., 1976. The genus *Metarhizium*. Transaction of the British Mycological Society. Cambridge, 66: 407-411.
- VALÉRIO, J.R., 1979. Cigarrinhas das pastagens: um problema de difícil solução. Revista Campo Agropecuário. Campo Grande, 2(15/16): 10-11.
- VALÉRIO, J.R. e A.R. OLIVEIRA, 1982. Cigarrinhas-das-pastagens: espécies e níveis populacionais no Estado de Mato Grosso do Sul e sugestões para seu controle. Campo Grande, EMPAER, EMBRAPA, 20p. [Circular Técnica, 1 e 9).
- VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pelerin. Mededelingen Lanbouwhogeschool Wageningen. Nederland, 68: 1-77.
- VEIGA, A.F.S.L., 1979. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., como opção para o controle biológico das cigarrinhas das pastagens (Homoptera, Cercopidae) no Estado de Pernambuco. Boletim Controle Biológico de Cigarrinhas por Fungos. Piracicaba, (1): 3-4.

- VEIGA, A.F.S.L.; M.L.M. AQUINO; G.P. ARRUDA, 1972. Nota sobre controle biológico da "cigarrinha-das-pastagens" (Hom.: Cercopidae) com o fungo entomôgeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. Pesq. Agrop. Nord., 4(2): 71.
- VELASCO, P., H., 1975. Influencia de la quema del pasto pangola sobre la población de mosca pinta y otros insectos. Agricultura Técnica en México. Enero, 3(10): 357-60.
- VENTURA, J.A. e J.C. MATIOLI, 1980. Ocorrência de epizootias causadas por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Ecosistema. Espírito Santo do Pinhal, 5(1): 92-95.
- VENTURA, J.A.; R.J. ARLEU e S.R. RIBEIRO, 1980. Controle biológico do *Metamasius hemipterus* L., 1764 (Col.: Curculionidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 6, Campinas. Resumos, p.159.
- VILLACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae* Sorok. In: 3º Congresso Latinoamericano de Entomologia e 5º Congresso Brasileiro de Entomologia, Ilhéus/Itabuna. Anais.

ZIMMERMANN, G., 1982 . Investigations on the efficacy of *Metarhizium anisopliae* on eggs and hatching first-instar larvae of *Otiorhynchus sulcatus*. Zeitschrift Zuer Angewandte Entomologie. Hamburg, 93(5): 476-482.