

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Elder Simões de Paula Batista

**NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COMO CONTROLADORES  
BIOLÓGICOS DE CIGARRINHAS DO GÊNERO *Mahanarva*  
(HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

Juiz de Fora

2010

Elder Simões de Paula Batista

**NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COMO CONTROLADORES  
BIOLÓGICOS DE CIGARRINHAS DO GÊNERO *Mahanarva* (HEMIPTERA:  
CERCOPIDAE)**

Dissertação Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Ciências Biológicas, área de  
concentração: Comportamento e Biologia  
Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora,  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre.

Orientador: Dr. Alexander Machado Auad

Juiz de Fora

2010

Elder Simões de Paula Batista

**NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COMO CONTROLADORES  
BIOLÓGICOS DE CIGARRINHAS DO GÊNERO *Mahanarva* (HEMIPTERA:  
CERCOPIDAE)**

Dissertação Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Ciências Biológicas, área de  
concentração: Comportamento e Biologia  
Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora,  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre.

Aprovada em 25/02/2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Alexander Machado Auad (Orientador)

Embrapa Gado de Leite

---

Dr. Erik Daemon

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

Universidade Federal de Lavras

Batista, Elder Simões de Paula.

Nematóides entomopatogênicos como controladores biológicos de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae) / Elder Simões de Paula Batista. – 2010.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Cana-de-açúcar. 2. Pragas agrícolas - controle. 3. Pastagens.  
I. Título.

CDU 664.11

Aos meus pais que acreditaram e confiaram nessa  
nova empreitada da minha vida, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força de vontade e serenidade

Aos meus pais, Vladimir e Leonor, pelo incentivo e apoio ininterruptos durante essa fase

A minha irmã, Érika, pelo carinho

Ao meu amor, Carolina, por fazer desses anos os melhores da minha vida

Ao meu orientador, Alexander Auad, pelos preciosos ensinamentos, auxílio constante, e por ensinar como um profissional deve se comportar

À Dra. Vanessa Andaló, pela contribuição fundamental para a execução dos trabalhos

Ao Dr. Eric Daemon, pelos ensinamentos

Ao Mestrado em Comportamento e Biologia animal pela oportunidade concedida

À Embrapa Gado de Leite por ter sido minha escola desde a graduação

Aos colegas de laboratório, Rodrigo, Dani, Livia, Simone, Caio, Bruno Veríssimo, Bruno Barbosa, Ricardo, Mariana, Priscila, Roberta, André, Amanda, Tiago, Aline, Andressa, Ana Elisa, Leonardo, Natana, Michelle pela convivência agradabilíssima e ajuda nos trabalhos

Aos meus eternos orientadores, John Furlong e Márcia Prata, pelo carinho com que me vêem

Ao amigo, Dedi, pelo companheirismo desde a faculdade

Ao parceiro, Caio Márcio, pelo intercâmbio de experiências

Aos amigos da República Tcheca, Rafael, Ueslei, Eder, Thiago, Douglas e Phillipe, pelo companheirismo nesses oito anos inesquecíveis

"A desobediência é uma virtude necessária à  
criatividade"

Raul Seixas

## RESUMO

As cigarrinhas do gênero *Mahanarva* causam danos às culturas da família Poaceae, como braquiária, capim-elefante e cana-de-açúcar, em função da sucção de seiva das raízes (fase imatura) e folhas (fase adulta). Com a crescente demanda de redução do uso de inseticidas químicos para o controle de insetos praga, surge a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de controle. Nesse cenário, o controle biológico recebe destaque e no caso das cigarrinhas, os nematóides entomopatogênicos (NEPs) são potenciais agentes de controle, pois exploram a superfície do solo, mesmo ambiente da praga enquanto esta se alimenta nas raízes. Portanto, com o objetivo de conhecer a ação de NEPs e selecionar isolados desses patógenos contra a cigarrinha-das-pastagens, *Mahanarva spectabilis*, e a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, experimentos foram desenvolvidos com diversos isolados de NEPs sobre diferentes fases de desenvolvimento do inseto. Em dois experimentos ninfas de *M. spectabilis* e *M. fimbriolata* foram expostos aos patógenos, em condições de laboratório e casa-de-vegetação e a partir daí foram selecionados os isolados mais patogênicos para cada espécie de praga. Em seguida, avaliou-se a eficiência de quatro métodos de aplicação de NEPs (pipetador, pulverização sobre ninfas com e sem espuma e inseto-cadáver) sobre a cigarrinha-das-pastagens, em casa-de-vegetação. Por último, avaliou-se a eficiência de uma espécie de NEP sobre ovos e adultos da cigarrinha-das-pastagens. Todos os isolados testados são patogênicos às ninfas das cigarrinhas causando mortalidade de 40 a 92% e 38 a 90% em condições de laboratório e 14 a 71% e 48 a 72% em casa-de-vegetação, para *M. spectabilis* e *M. fimbriolata*, respectivamente. Os métodos de aplicação mais eficientes foram o de pulverização sobre ninfas com espuma e inseto-cadáver, não havendo diferença na eficiência provocada pelas concentrações e isolados utilizados. Observou-se que não ocorre infecção de NEPs sobre ovos de cigarrinha-das-pastagens. Os adultos da cigarrinha não foram infectados pelos NEPs, e não houve redução no número de ovos em função da presença do patógeno. Dos isolados testados, os mais eficientes foram *Steinernema riobravis*, *S.feltiae* e *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 para *M. spectabilis* e *S. feltiae*, *S. riobravis*, *H. baujardi* LPP7 e *S. carpocapsae* para *M. fimbriolata*. Conclui-se portanto que nematóides entomopatogênicos podem ser utilizados no controle de cigarrinhas do gênero *Mahanarva*, sendo incluídos em programas de manejo integrado, devendo ser empregados contra as ninfas, pulverizados sobre a espuma ou através de inseto-cadáver.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Controle biológico. Pastagens. *Steinernema*. *Heterorhabditis*.



## ABSTRACT

The spittlebugs belonging to the genus *Mahanarva* cause damage to the Poaceae family cultures, like signal grass, elephant grass and sugar cane, by the sap feeding on roots (immature phase) and leaves (adult phase). With the increase demand to reduce use of chemical insecticides for the insect pests' control, comes the need to develop new control methods. In this scenario, the biological control gains highlight and in the spittlebugs case, the entomopathogenic nematodes (EPNs) are potential control agents, exploring the soil surface, the same pest environment while it feeds on roots. Thus, with the aim to know the EPNs' action and to screening strains of these pathogens against the leaf spittlebug, *Mahanarva spectabilis*, and the root spittlebug, *Mahanarva fimbriolata*, experiments were conducted with various EPNs strains over different insect development phases. In two experiments *M. spectabilis* and *M. fimbriolata* nymphs were exposed to the pathogens, in laboratory and greenhouse conditions, and then were screened the more pathogenic strains to each pest species. Following, were evaluated the efficiency of four application methods of EPNs (pippeting, spray over nymphs with and without froth and infected host cadaver) over the leaf spittlebug, at greenhouse. At last, were evaluated the efficiency of an EPN species over eggs and adults of the leaf spittlebug. All tested strains are pathogenic to the spittlebugs nymphs causing 40-92% and 38-90% mortality at laboratory and 14-71% and 48-72% at greenhouse, to *M. spectabilis* and *M. fimbriolata*, respectively. The more efficient application methods were spray over nymphs with froth and infected host cadaver, with no difference because the concentrations and strains. Observations showed that don't occurs eggs infection by EPNs in leaf spittlebugs. The leaf spittlebug adults not were infected by the EPNs, and no egg reduction were observed. The most pathogenic EPNs strains were *Steinernema riobravis*, *S.feltiae* and *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 to *M. spectabilis* and *S. feltiae*, *S. riobravis*, *H. baujardi* LPP7 and *S. carpocapsae* to *M. fimbriolata*. Thus I conclude that entomopathogenic nematodes can be utilized to control *Mahanarva* genus spittlebugs, and can be inserted in integrated pest management programs, should to be applied over nymphs exclusively, sprayed over the froth or through infected host cadevers.

Keywords: Biological control. *Heterorhabditis*. Pastures. *Steinernema*. Sugar cane.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Importância da cana-de-açúcar e das pastagens</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Cigarrinhas como praga de cana-de-açúcar e pastagens</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3 Nematóides entomopatogênicos</b> .....	<b>13</b>
<b>3 PATOGENICIDADE DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS À CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS</b> .....	<b>17</b>
<b>4 MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DA CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS</b> .....	<b>28</b>
<b>5 NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS INFECTAM OVOS E ADULTOS DE CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS?</b> .....	<b>38</b>
<b>6 SELEÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE <i>Mahanarva fimbriolata</i> (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)</b> .....	<b>49</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A primeira década do século XXI foi marcada pela crescente preocupação com o planeta, no que diz respeito à utilização dos recursos naturais, desde a prospecção de energia, até o aproveitamento das áreas agriculturáveis. As ações humanas no ambiente se refletem na temperatura global e diretamente na saúde pública.

No âmbito da agricultura, há demanda de melhor utilização da água através de seu reaproveitamento e a preocupação com a sanidade vegetal que, além de problemas com plantas daninhas, nematóides fitófagos, fungos fitopatogênicos e viroses, também considera os insetos-praga de cada cultura. O controle mais utilizado para estas pragas é o químico que, apesar da eficiência, representa uma ameaça ao ambiente, levando a um acúmulo exagerado destes produtos no ambiente e que conseqüentemente chega ao consumidor através de alimentos e água contaminada, além de elevarem os custos de produção, tudo isso devido ao uso indiscriminado dessa prática.

Na tentativa de minimizar esses efeitos tem se dado maior atenção a opções menos nocivas ao ambiente, que utilizam de estratégias sustentáveis para o manejo de pragas, como o emprego de cultivares resistentes ou inimigos naturais como controladores biológicos.

No cultivo de forrageiras da Família Poaceae, como cana-de-açúcar, braquiária e capim-elefante, as cigarrinhas recebem destaque como praga em função dos danos que provocam através da sucção de seiva das plantas, o que diminui a produção e influencia no preço final dos produtos que dependem da cadeia a que pertencem essas culturas.

No caso da cana-de-açúcar, destaca-se a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), que com a gradativa redução da prática da colheita com queima da palha e conseqüente expansão da colheita mecânica, teve sua população aumentada, pois as folhas da planta que cobrem o solo formam um ambiente ideal para o desenvolvimento das ninfas desse inseto que se alimentam da seiva da raiz (RAVANELI et al., 2006).

As pastagens do Brasil sofrem também com o ataque da cigarrinha *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) que é considerada uma das pragas limitantes da produção (AUAD et al., 2007), pois sua população apresenta picos nos meses quentes e úmidos de verão, quando as pastagens deveriam se recuperar da seca dos meses anteriores.

Dentre os métodos de controle biológico, o uso de nematóides entomopatogênicos (NEPs) da Ordem Rhabditida se apresenta de forma promissora, já que estes exploram o mesmo ambiente das ninfas de cigarrinhas e são conhecidamente eficazes contra outras pragas de solo e ambientes críticos, pois são capazes de buscar ativamente o hospedeiro com o auxílio de pistas químicas que estes liberam, como gás carbônico. Esses patógenos infectam insetos penetrando por suas aberturas naturais ou atravessando o tegumento, causando a morte do hospedeiro em 48-72 horas (KAYA & GAUGLER, 1993).

Respondendo a esse problema o presente trabalho teve o objetivo de selecionar alguns isolados para o controle da cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata* e da cigarrinha-das-pastagens, *M. spectabilis*, bem como verificar a patogenicidade de nematóides entomopatogênicos sobre as diferentes fases de desenvolvimento destes insetos e testar alguns métodos de aplicação de NEPs sobre ninfas das cigarrinhas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da cana-de-açúcar e das pastagens

Um tema cada vez mais discutido é o desenvolvimento de fontes renováveis de energia. Com a escassez das reservas, a constante tendência de aumento de preço do petróleo e a iminência de mudanças climáticas provocadas pela utilização predominante de combustíveis fósseis, a agroenergia surge como importante alternativa ao futuro do planeta e à geração de renda. A energia consumida no Brasil, comparada às de outros países, é bastante limpa, pois 45% do total tem origem em fontes renováveis. A contribuição da cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* (Linnaeus, 1758), se dá não apenas pelo álcool, mas também pelo resíduo sólido das usinas de cana, o bagaço, que é destinado a produção de energia térmica, mecânica e elétrica (MAPA/SPAEE, 2007).

A cultura da cana-de-açúcar nacional movimenta, em torno de 40 bilhões de reais por ano, direta e indiretamente, o que corresponde a cerca de 3,65% do PIB; gera 4 milhões de empregos diretos e indiretos e conta com 72 mil agricultores (MACHADO, 2008).

Além do açúcar e do álcool, surgem na indústria sucroalcooleira produtos como ração para gado e peixe, fermento para pão, levedura seca, ácido cítrico e plástico biodegradável. A cana-de-açúcar é o vegetal que produz maior massa orgânica por hectare, sendo esta maior do que a da floresta amazônica, superando-a também como sequestradora do carbono atmosférico. É considerada planta conservacionista, evitando a erosão provocada pela chuva, garantindo o futuro do solo e a sua fertilidade (JUNQUEIRA, 2008).

As pastagens possuem acentuada importância no fornecimento de alimento para vacas em lactação e gado bovino de corte (DERESZ, 1999), servindo como base da dieta desses bovinos e representam uma das formas mais seguras de se elevar a produtividade e minimizar os custos de produção (ARA et al., 1999). Entre as mais utilizadas para alimentação desses animais estão o capim-elefante, *Penisetum purpureum* (Schum) (COSTA & GONÇALVES, 1988), que se destaca pela alta produtividade e qualidade da forragem (XAVIER et al., 2001) e *Brachiaria decumbens* Stapf (VALLE et al., 1994), que adapta-se às mais variadas condições de solo e clima, proporcionando produções satisfatórias de forragem em solos cuja fertilidade varia de baixa a média (ARA et al., 1999).

## 2.2 Cigarrinhas como praga de cana-de-açúcar e pastagens

As cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) sugam a seiva das partes aéreas e raízes das plantas prejudicando o desenvolvimento destas. Sua ocorrência está normalmente relacionada a regiões de clima tropical e subtropical. São reconhecidas pela espuma que recobre sua forma imatura que se instala junto às raízes da planta (STINGEL, 2005).

As fêmeas ovipositam na superfície ou em lacunas do solo ou da planta. As ninfas recém-eclodidas logo inserem seu aparelho bucal nas radículas e iniciam a sucção de água e nutrientes, seguida da produção de uma espuma que recobre e protege o corpo contra inimigos e dessecação. Estas ninfas passam por cinco ínstaes, e após esse período emergem da espuma já na forma adulta. No final da estação chuvosa os adultos, que se alimentam da seiva das folhas, fazem postura de ovos diapáusicos que resistem ao período seco, vindo a eclodir na estação chuvosa seguinte dando início a um novo ciclo (GARCIA et al., 2006).

São pragas que atacam as pastagens exatamente nos meses quentes e úmidos de verão, quando estas deveriam se recuperar da seca sofrida nos meses anteriores. Uma das principais demandas dos produtores de gado bovino refere-se ao desenvolvimento de cultivares de pastagens resistentes às cigarrinhas, mas a ausência dessas informações tem limitado as recomendações de medidas de controle que poderiam contribuir para a minimização dos impactos causados por esta praga (AUAD et al., 2007). Segundo Holmann & Peck (2002) a produção de leite e carne em um sistema que utilize pastagem com alto nível de infestação de cigarrinhas (50 adultos/m<sup>2</sup>) pode ser prejudicada em até 54% e o custo da produção desses insumos pode aumentar em até 30%, sob tal nível de infestação.

O fato de a cana-de-açúcar ser uma forrageira pode explicar a fácil adaptação dos cercopídeos a essa cultura, já que são insetos originalmente sugadores de seiva de forrageiras utilizadas como pastagens (LONG & HENSLEY, 1972).

No caso da cana-de-açúcar, a cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata*, é a espécie mais importante, sendo relatada em diversas regiões do país. Com o gradativo aumento da colheita mecanizada da cana crua, o ambiente criado pela palha sobre o solo favorece o desenvolvimento de ovos e ninfas, e acrescenta importância à cigarrinha (DINARDO-MIRANDA & GIL, 2007).

Os danos causados por pragas nos canaviais fazem com que a produção e a qualidade da matéria prima seja diminuída o que se reflete no mercado de insumos e derivados. DINARDO-MIRANDA et al. (2001) encontraram reduções de 23,6 a 72% na produtividade de canaviais atacados por *M. fimbriolata*, dependendo da variedade

considerada. Ainda de acordo com esses autores, a colheita tardia apresenta-se mais afetada ao ataque das cigarrinhas.

Para o manejo integrado desta praga, o método cultural é utilizado através de diferentes épocas de colheita nas lavouras de cana. DINARDO-MIRANDA et al. (2001) observaram que a cultura colhida no mês de maio foi a mais atacada pela cigarrinha, quando comparada àquelas colhidas em agosto e outubro.

A estratégia de controle físico afastando a palha que recobre o solo das touceiras reduz a população da praga, mas não elimina a possibilidade de ocorrência da mesma. Sugere-se ainda a queima da palhada, o que destrói principalmente os ovos e formas juvenis deste inseto, mas essa prática está sendo cada vez menos utilizada, já que um decreto de 1997 prevê a redução progressiva das queimadas para o estado de São Paulo (STINGEL, 2005).

O método químico é o mais utilizado em cana-de-açúcar por ser o mais eficiente. Apesar disso, apresenta inconveniências como o caráter cumulativo ambiental, o que pode acarretar em desequilíbrio do ecossistema da lavoura, eliminando inimigos naturais da praga, provocando surtos de pragas secundárias, promovendo surgimento de pragas resistentes, além de um elevado custo; sendo essa última característica a que impossibilita o uso em pastagens (MACEDO, 2005).

O método biológico é também bastante difundido e promissor em ambas culturas, visto que numerosas pesquisas desenvolvidas com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente controlador têm relatado sucesso desse método de controle (ALMEIDA et al., 2003; BATISTA FILHO et al., 2003; DINARDO-MIRANDA et al., 2004; LOUREIRO et al., 2005).

Além dos fungos entomopatogênicos surge a possibilidade de utilização de nematóides entomopatogênicos (NEPs), que já são conhecidos controladores de diversas pragas agrícolas (LIU et al., 2000; HAZIR, 2003). No que diz respeito à cigarrinha-das-raízes, ainda são poucos os testes a respeito da patogenicidade de NEPs sobre estes insetos (LEITE et al., 2002; LEITE et al., 2005).

### **2.3 Nematóides entomopatogênicos**

Nematóides entomopatogênicos pertencem à Ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), onde estão localizadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. Estes são assim conhecidos pois causam doença e morte a diferentes espécies de insetos com grande rapidez. Possuem relação mutualística com bactérias que carregam no seu tubo digestivo, e

estas são as responsáveis pela rápida morte do hospedeiro por septicemia. São importantes agentes de controle biológico de insetos de solo e ambientes crípticos.

O ciclo de vida destes nematóides inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto (fêmeas e machos). No gênero *Steinernema*, a fase juvenil é composta por quatro estádios (J1, J2, J3 ou Juvenil Infectante e J4). O juvenil infectante (JI) é o estádio do nematóide encontrado no solo, que porta as bactérias simbiotes. Estes buscam o inseto e o localizam pelos produtos de excreção, níveis de CO<sub>2</sub> e gradientes de temperatura. A infecção é iniciada com a penetração dos nematóides pelas aberturas naturais (boca, ânus ou espiráculos); dentro do inseto migram para hemolinfa e liberam bactérias do gênero *Xenorhabdus*. Estas produzem toxinas e matam o hospedeiro por septicemia em 24 a 48 horas. Em seguida começam a multiplicar-se e posteriormente os JIs alimentam-se delas e dos tecidos por elas decompostos, passando então para o estádio J4. Deste estádio, irão se formar as fêmeas e machos (fase adulta) da primeira geração; estas fêmeas colocam ovos que darão origem a segunda geração (KAYA & GAUGLER, 1993).

O ciclo dos heterorhabditídeos é muito semelhante aos dos steinermatídeos, com algumas ressalvas. Os JIs desta família, além de penetrar pelas aberturas naturais, podem também penetrar através da cutícula do inseto hospedeiro utilizando um dente quitinoso localizado frontalmente em sua extremidade anterior. Chegando à hemolinfa liberam bactérias do gênero *Photorhabdus*. Na primeira geração dentro do inseto, ao invés de surgirem fêmeas e machos, ocorrem apenas adultos hermafroditas, que produzem os demais estádios (ovos, J1, J2, J3 e J4). Na geração seguinte, os adultos diferenciam-se em machos e fêmeas (KAYA & GAUGLER, 1993).

Para ambos gêneros o número de gerações dentro do cadáver do inseto varia de acordo com a quantidade de alimento disponível, podendo ser duas ou três. Quando o alimento é exaurido, juvenis no terceiro estádio retêm células da bactéria em seu interior e abandonam o cadáver como JIs. Os JIs podem permanecer no solo à procura de um novo inseto hospedeiro por meses, dependendo da temperatura, da umidade do solo e da espécie de nematóide envolvida (SMITH et al., 1992).

NEPs possuem algumas características que os tornam potenciais controladores naturais de pragas agrícolas como: a) JIs (estádio que fica no solo e penetra no hospedeiro) podem ser produzidos com baixo custo em hospedeiros-cobaia ou em meios artificiais; b) podem ser armazenados em pouco espaço; c) são facilmente aplicados em campo, pela água de irrigação ou por pulverização; d) são capazes de buscar o inseto-alvo; e) resistem a vários inseticidas, possuindo, dessa forma, ação sinérgica com produtos químicos, f) não causam



dano a vertebrados, g) reproduzem-se no próprio hospedeiro, sendo, assim, auto-sustentáveis, h) muitas espécies possuem uma ampla gama de hospedeiros e são altamente virulentos, causando morte rápida. Essa combinação de atributos e o grande espectro estimulam investigações sobre o isolado de NEP mais adequado para uma dada praga (LIU et al., 2000).

Algumas espécies de NEPs esperam pelo hospedeiro na superfície do solo ou próximo a ela, enquanto outras estão adaptadas a procurar em camadas mais profundas do solo. O primeiro grupo tem sido referido como “emboscador” (forrageador passivo), o qual permanece imóvel enquanto espera pelo hospedeiro. O outro é conhecido como “cruzador” (forrageador ativo), o qual é bastante ativo e responde a pistas químicas de um hospedeiro distante, sendo assim mais adequado para combater hospedeiros sedentários (CAMPBELL & GAUGLER, 1993; GREWAL et al., 1994).

A literatura em torno da utilização de NEPs como controladores de pragas agrícolas é grande. Grewal et al. (2001) relataram a promissora possibilidade de utilização de NEPs no Brasil e outros países da América do Sul. Alves et al. (2005) constataram a patogenicidade de *Steinernema carpocapsae* e *S. glaseri* (Steiner, 1929) sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797). Acevedo et al. (2007) avaliaram a interação de *Metarhizium anisopliae* e *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 Poinar, 1975, no controle da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794). Machado et al. (2005) avaliaram a patogenicidade de NEPs contra ovos e larvas do besouro *Migdolus fryanus*. Em todos estes trabalhos a susceptibilidade dos hospedeiros a diferentes espécies e isolados de NEPs foi acentuada, evidenciando a possibilidade de utilização em variados sistemas agrícolas.

Pesquisas visando o desenvolvimento de métodos que otimizem a criação de NEPs em laboratório e sua utilização em campo foram realizadas. Andaló et al. (2008) avaliaram substâncias na preservação de nematóides entomopatogênicos em laboratório. Del Valle et al. (2005) avaliaram a tolerância de uma espécie de nematóide a elevadas temperaturas. Andaló et al. (2005) relataram o efeito de diferentes temperaturas e concentrações na sobrevivência de NEPs em condições de armazenamento. Lara et al. (2008) testaram o efeito de microaspersores utilizados na aplicação de juvenis infectantes de uma espécie de NEP. Koppenhöfer et al. (2002), Negrisoni Jr. et al. (2008) e Reis-Menini et al. (2008) constataram a compatibilidade entre NEPs e produtos fitossanitários.

Sobre o comportamento de NEPs contra a cigarrinha-das-raízes, Leite et al. (2002) e Leite et al. (2005) avaliaram a eficiência de nematóides contra a *M. fimbriolata* e constataram até 100% de mortalidade de ninfas, sob condições de laboratório, quando o

nematóide utilizado foi do gênero *Heterorhabditis*; mostrando o potencial de utilização desses patógenos para o controle da referida praga.

### SEÇÃO 3

## PATOGENICIDADE DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS À CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a patogenicidade de nove isolados de nematóides entomopatogênicos (NEPs) à cigarrinha-das-pastagens sob condições de laboratório e casa-de-vegetação. Ninfas de quarto e/ou quinto instar de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) foram expostas aos NEPs em condições de laboratório, e os isolados mais patogênicos foram aplicados sobre as ninfas em casa-de-vegetação nas concentrações de 2000 e 4000 NEPs/mL. A eficiência do agente patogênico foi confirmada por meio da dissecação dos hospedeiros mortos. Todos os isolados testados foram patogênicos às ninfas de *M. spectabilis* em laboratório, com destaque para *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravus* e *Heterorhabditis amazonensis* RSC1, com mais de 80% de mortalidade de ninfas. A concentração não influenciou na eficiência dos isolados e, aqueles selecionados em laboratório apresentaram eficiência semelhante entre si em casa-de-vegetação, exceto *S. carpocapsae*, que foi inferior aos demais. Nematóides entomopatogênicos podem ser inseridos em programas de manejo integrado de *M. spectabilis*. Palavras-chave: controle microbiano, *Heterorhabditis*, pastagens, *Mahanarva spectabilis*, *Steinernema*.

### ABSTRACT

Pathogenicity of entomopathogenic nematodes to the spittlebug – The aim of this study was to evaluate the pathogenicity of nine entomopathogenic nematodes (EPNs) against the spittlebug, under laboratory and greenhouse conditions. Eggs in different embryonic development phases and fourth/fifth instar nymphs of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) were exposed to EPNs at laboratory conditions, and the more pathogenic isolates were applied at greenhouse under 2000 and 4000 EPNs/mL concentrations. The pathogenic agent efficiency was ensured through the dead hosts dissection. The nematodes were not capable to penetrate the cercopids eggs. All isolates were pathogenic to *M. spectabilis* nymphs at laboratory, highlight to *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravus* e *Heterorhabditis amazonensis* RSC1, with more than 80% of nymph mortality. The concentration do not influenced the isolates efficacy and, those screened at laboratory showed same efficiency at

greenhouse, except *S. carpocapsae*, that were inferior to the others. Entomopathogenic nematodes can be introduced in *M. spectabilis* integrated management programs.

Keywords: biological control, *Heterorhabditis*, pastures, *Mahanarva spectabilis*, *Steinernema*.

## INTRODUÇÃO

No cultivo de forrageiras destacam-se como praga as cigarrinhas, que se alimentam da seiva dessas plantas tanto na fase imatura, sugando a partir do sistema radicular, quanto na fase adulta, que ao se alimentar nas folhas injetam toxinas causando amarelecimento destas, ocasionando a “queima” das folhas. No Brasil, a cigarrinha *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) é considerada uma das pragas limitantes da produção de forrageiras (AUAD et al., 2007). Segundo Holmann & Peck (2002) a produção de leite e carne em um sistema que utilize pastagem com alto nível de infestação de cigarrinhas (50 adultos/m<sup>2</sup>) pode ser prejudicada em até 54% e o custo da produção desses insumos pode aumentar em até 30%, sob tal nível de infestação.

A utilização de produtos fitossanitários apresenta restrições ambientais e econômicas e, com a necessidade de implantação de programas de manejo integrado de pragas, tem-se dado atenção às variedades de forrageiras resistentes às cigarrinhas (AUAD et al., 2007) ou à utilização de agentes de controle biológico, dos quais destacam-se os fungos entomopatogênicos entre os mais estudados, como nos trabalhos de Batista Filho et al. (2003) e Loureiro et al. (2005); contudo, ambas as estratégias apresentam peculiaridades acerca de sua utilização. Nesse cenário, surge a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias para o manejo dessa praga.

Buscando novos agentes de controle biológico, nematóides entomopatogênicos (NEPs) recebem destaque, pela rapidez com que combatem o hospedeiro, pela facilidade de produção em massa com baixo custo e pelo amplo espectro de hospedeiros susceptíveis (GEORGIS et al., 2006), além de serem compatíveis e apresentarem a possibilidade de utilização sinérgica, podendo ocorrer inclusive ação aditiva com produtos fitossanitários (KOPPENHÖFER et al., 2002, NEGRISOLI Jr. et al., 2008, REIS-MENINI et al., 2008). Apresentam ainda a capacidade de buscarem hospedeiros de hábitos crípticos (KAYA & GAUGLER 1993) como as cigarrinhas-das-pastagens.

Entre os isolados de NEPs ocorrem sensíveis diferenças no que tange ao comportamento, em relação à emersão a partir do hospedeiro, método de penetração,

estratégia de forrageio e busca, diferenças fisiológicas; além de a concentração desses patógenos no ambiente e a praga a ser combatida também serem fatores importantes (LEWIS et al., 2006), o que explica a especificidade de cada um deles e justifica o desenvolvimento de experimentos de seleção de isolados adequados para as espécies de praga.

A eficiência de NEPs é conhecida contra diversas pragas agrícolas (GREWAL et al., 2001) entre elas, pragas de cultivos protegidos como *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) (Diptera: Sciaridae) (LEITE et al., 2007), o bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) (CABANILLAS, 2003), pragas de grãos armazenados como *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Phycitidae) (RAMOS-RODRÍGUEZ et al., 2007), pragas de solo como *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) (SOUZA, 2006), além de ectoparasitos de importância veterinária (KOCAN et al., 1998). Apenas dois trabalhos foram publicados com cercopídeos como alvo de controle por nematóides, nos quais *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) foi a praga estudada (LEITE et al., 2002, LEITE et al., 2005).

Considerando que o conhecimento acerca da eficiência de NEPs é escasso e pouco conclusivo para as cigarrinhas-das-pastagens, o objetivo do presente estudo foi conhecer a patogenicidade de diferentes concentrações e isolados de NEPs sobre ovos e ninfas de *M. spectabilis* em condições de laboratório e casa-de-vegetação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Origem e manutenção de plantas de capim-elefante**

As plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumacher) cv. Pioneiro utilizadas nos ensaios de casa-de-vegetação foram oriundas do Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite, das quais obtiveram-se mudas, por meio de estacas de um nó, que foram plantadas e mantidas em copos descartáveis de 500ml em substrato de terra/esterco (1:1) e alocadas em casa-de-vegetação sob regime de irrigação por aspersão duas vezes por dia.

### **Origem e manutenção de nematóides entomopatogênicos**

Os nematóides utilizados foram cedidos pelo Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, adicionados à criação mantida no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite e multiplicados de acordo

com metodologia proposta por Kaya & Stock (1997) e White (1927), utilizando larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) como hospedeiro. São eles: *Steinernema anomali* Kozodoi, 1984, *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) Woulds, Mracek, Gerdin e Bedding 1982, *S. feltiae* (Filipjev, 1934) Woulds, Mracek, Gerdin e Bedding 1982, *S. riobravus* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994, *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 Andaló, Nguyen & Moino Jr. 2006, *H. amazonensis* RSC5, *Heterorhabditis* sp. JPM3, *Heterorhabditis indica* LPP1 Poinar, Karunakar & David, 1992 e *Heterorhabditis* sp. PI.

### **Obtenção de ninfas de *Mahanarva spectabilis***

As ninfas foram oriundas da criação mantida pelo Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite em casa-de-vegetação, onde os indivíduos se desenvolvem tendo plantas de capim-elefante e braquiária como hospedeiras.

### **Mortalidade ninfal de *Mahanarva spectabilis* provocada por nematóides entomopatogênicos em laboratório**

Devido à dificuldade de distinção entre os ínstars, foram utilizadas ninfas de quarto e/ou quinto ínstar, pois estes são os últimos estádios de desenvolvimento imaturo, nos quais os indivíduos são mais vigorosos e possuem maior capacidade de produção de espuma, o que confere maior proteção aos indivíduos.

Foram colocadas cinco ninfas de quarto e/ou quinto ínstar em uma placa de Petri (9 cm Ø) forrada com papel filtro onde, em seguida, foram submetidas a 2 mL de solução aquosa com 2000 JI/mL, conforme Leite et al. (2005), de cada isolado de NEPs separadamente, formando-se nove tratamentos (isolados) com dez repetições e um grupo controle para certificar que as ninfas estavam isentas do contato prévio com nematóides e que as mortes provocadas por esses patógenos ocorreram exclusivamente em função dos tratamentos. As placas foram vedadas com filme plástico e armazenadas em câmara climatizada a 25°C, 70% de UR e 12 horas de fotofase. Após sete dias de exposição, as ninfas mortas foram dissecadas e sua hemolinfa observada em microscópio estereoscópico e, verificando-se a presença de nematóides, considerava-se a ninfa morta por este patógeno.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

### **Mortalidade ninfal de *Mahanarva spectabilis* provocada por nematóides entomopatogênicos em casa-de-vegetação**

Uma ninfa de quarto ou quinto ínstar da cigarrinha foi acondicionada na base de uma muda de capim-elefante plantada em copo plástico com raízes previamente expostas e alocadas em casa-de-vegetação, que durante o experimento teve temperatura média de 21,5°C e umidade relativa de 94%. Após 24 horas, quando a ninfa já estava plenamente protegida pela espuma produzida, os nematóides que apresentaram patogenicidade maior ou igual a 80% no ensaio com ninfas em laboratório foram aplicados em duas concentrações (2000 e 4000 JI/mL) em volume total de 2 mL por copo, com o auxílio de um borrifador de ponta centrífuga, sendo o jato direcionado sobre a espuma.

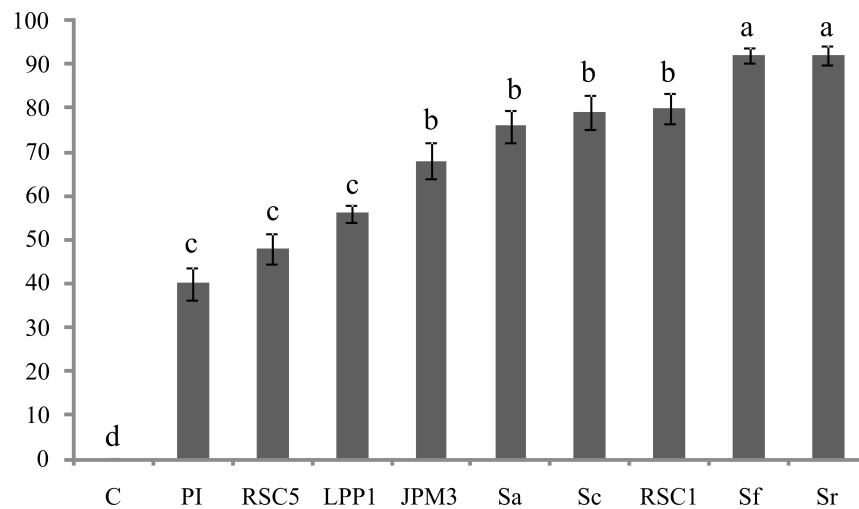
Dessa forma, o delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial com quatro isolados e duas concentrações, totalizando oito tratamentos e sete repetições. Foi montado um grupo controle com sete repetições a fim de se confirmar que o substrato utilizado nas unidades experimentais estava isento de nematóides e, conseqüentemente, as mortes causadas por estes patógenos foram em função dos tratamentos. A partir daí as ninfas foram acompanhadas diariamente, sendo as mortas dissecadas e observadas ao microscópio estereoscópico para a constatação da presença de nematóides, que em caso positivo foram considerados os causadores da morte da ninfa.

O efeito dos isolados e concentrações utilizadas nos diferentes ambientes foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Mortalidade ninfal de *Mahanarva spectabilis* provocada por nematóides entomopatogênicos em laboratório**

No ensaio em laboratório, verificou-se que os isolados provocaram mortalidade às ninfas de *M. spectabilis*, sendo *S. riobravis* e *S. feltiae* os que tiveram eficiência destacada, ambos causando 92% de mortalidade. *H. amazonensis* RSC1, *S. carpocapsae*, *S. anomali* e *Heterorhabditis* sp. JPM3 apresentaram eficiência intermediária com 80%, 79%, 76% e 68% de mortalidade, respectivamente. Os demais (*H. indica* LPP1, 56%; *H. amazonensis* RSC5, 48% e *Heterorhabditis* sp. PI, 40%) constituíram um grupo com menor patogenicidade, tendo diferido significativamente do grupo controle (Figura 1).



**Figura 1.** Mortalidade ninfal  $\pm$  erro padrão provocada por isolados de nematóides entomopatogênicos à ninfas de *Mahanarva spectabilis* na concentração de 2000 JIs/mL sob condições de laboratório. C (Controle), PI (*Heterorhabditis* sp. PI), RSC5 (*H. amazonensis* RSC5), LPP1 (*H. indica* LPP1), JPM3 (*Heterorhabditis* sp. JPM3), Sa (*Steinernema anomali*), Sc (*S. carpocapsae*), RSC1 (*H. amazonensis* RSC1), Sf (*S. feltiae*), Sr (*S. riobravivis*).

O presente estudo corrobora o de Cabanillas (2003) que verificou *S. riobravivis* TX como o mais eficiente contra *A. grandis*, causando mortalidade de 100% das larvas desta praga do algodão em condições de laboratório, além de observar que a  $CL_{50}$  para este nematóide foi a menor entre os testados (2 JIs/inseto). Outras pesquisas foram desenvolvidas com esta espécie de nematóide, como o estudo de Ramos-Rodríguez et al. (2007), que observaram menor eficácia, comparada à presente pesquisa, contra *T. castaneum* e *P. interpunctella* em laboratório, controlando 72,6% e 73% dos indivíduos, respectivamente.

*Steinernema feltiae* apresentou elevada patogenicidade no controle da cigarrinha em laboratório, sendo também a espécie mais eficiente contra o cupim de montículo *C. cumulans*, controlando 88,3% dos indivíduos em placas de Petri (SOUZA, 2006).

Avaliando alguns isolados de NEPs contra a cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata*, Leite et al. (2005) aplicaram 2000 JI/mL sobre ninfas de quinto instar em placas de Petri e verificaram eficiência de 100%, 98% e 96% para os isolados *Heterorhabditis* sp. (CB-n5), *Steinernema* sp. (CB-n6) e *Heterorhabditis* sp. (CCA), respectivamente, o que configura diferença em relação ao presente estudo, no qual se verificou que as espécies do gênero *Heterorhabditis* apresentaram nível de controle no máximo de 80%, quando se esperava resultado semelhante, já que as duas espécies de cigarrinha em questão são muito semelhantes no que diz respeito ao comportamento, fisiologia e anatomia.



Observou-se que *H. amazonensis* RSC5 e *H. amazonensis* RSC1; e *Heterorhabditis* sp. JPM3 e *Heterorhabditis* sp. PI apresentaram patogenicidades diferentes. Variações da mesma natureza ocorreram no trabalho de Cabanillas (2003) em que se notou que dois isolados de *S. riobravus* (TX e 355<sup>d</sup>) e três de *H. bacteriophora* (IN, HbL e HP88) apresentaram patogenicidade e concentrações letais diferentes contra o coleóptero *A. grandis*. Constatou-se diferença também entre isolados de *S. carpocapsae* (All, Breton e DD136) no que diz respeito ao tempo letal destes contra *Boophilus annulatus* (MAULÉON et al., 1993). Embora sejam isolados da mesma espécie isso ocorre devido às diferenças acerca do comportamento, em relação à emersão, estratégia de forrageio e busca do hospedeiro; diferenças fisiológicas e tolerância a fatores abióticos que ocorrem entre os diferentes isolados de NEPs (LEWIS et al., 2006).

A partir dos resultados obtidos no experimento em laboratório, selecionaram-se os isolados *S. riobravus*, *S. feltiae*, *H. amazonensis* RSC1 e *S. carpocapsae* para os ensaios em casa-de-vegetação.

#### **Mortalidade ninfal de *Mahanarva spectabilis* provocada por nematóides entomopatogênicos em casa-de-vegetação**

Constatou-se que todos os isolados sob as duas concentrações (2000 e 4000 JIs/mL) apresentaram patogenicidade contra as ninfas de *M. spectabilis*, destacando-se *S. riobravus* na concentração de 2000 JI/mL como a mais virulenta, apresentando 71,43% de mortalidade, seguida de *H. amazonensis* RSC1 (2000 JI/mL), *S. feltiae* (4000 JI/mL), *H. amazonensis* RSC1 (4000 JI/mL) e *S. riobravus* (4000 JI/mL), estes apresentando 57,14% de patogenicidade. *Steinernema feltiae* (2000 JI/mL) e *S. carpocapsae* (4000 JI/mL) com 28,57% e *S. carpocapsae* (2000 JI/mL) com 14,29%, apresentaram patogenicidade estatisticamente inferior às demais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Mortalidade ninfal  $\pm$  erro padrão de *Mahanarva spectabilis* provocada pelos isolados de nematóides entomopatogênicos aplicados em duas concentrações, sob condições de casa-de-vegetação.

Isolado	Mortalidade (%)		Média total
	Concentrações (JI/ml)		
	2000	4000	
<i>S. riobravis</i>	71,43 $\pm$ 1,84 Aa	57,14 $\pm$ 2,01 Aa	64,28 $\pm$ 1,33 A
<i>S. feltiae</i>	28,57 $\pm$ 1,84 Ba	57,14 $\pm$ 2,01 Aa	42,85 $\pm$ 1,37 A
<i>H. amazonensis</i> RSC1	57,14 $\pm$ 2,01 Aa	57,14 $\pm$ 2,01 Aa	57,14 $\pm$ 1,37 A
<i>S. carpocapsae</i>	14,29 $\pm$ 1,43 Ba	28,57 $\pm$ 1,84 Ba	21,43 $\pm$ 1,14 B
<b>Média total</b>	42,86 $\pm$ 0,95 a	49,99 $\pm$ 0,96 a	

Valores seguidos de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

A maior virulência apresentada por *S. riobravis* possivelmente se explica pela sua capacidade de movimentação no solo, alcançando média de 4cm/dia de deslocamento horizontal, além de sua distribuição ocorrer de forma agregada (CABANILLAS & RAULSTON 1994), possibilitando o encontro do hospedeiro por vários juvenis infectantes. Essa característica possibilitou que a alta patogenicidade observada em laboratório fosse mantida em casa-de-vegetação.

As concentrações não influenciaram a patogenicidade dos isolados de NEPs testados, resultado semelhante ao encontrado por Leite et al. (2007) verificando que *H. indica* (IBCB-n05) pulverizado sob as concentrações de 5,7 e 22,6 JI/cm<sup>2</sup> não apresentou diferença estatística, atingindo 75% e 85% de eficiência, respectivamente, no controle de larvas de *B. mabiusi* em casa-de-vegetação. Isso ocorre provavelmente pelo fato de a solução com menor concentração oferecer o nível máximo de controle que estes patógenos podem atingir e um acréscimo nessa solução não aumentaria significativamente a capacidade de controle.

Após a seleção do isolado mais virulento contra *M. fimbriolata* em laboratório, Leite et al. (2005) testaram a eficiência deste em campo sob diferentes concentrações, verificando que *Heterorhabditis* sp. proporcionou um máximo de 70% de controle da cigarrinha, com as concentrações não diferindo entre si. No presente trabalho o nematóide do gênero *Heterorhabditis* não foi o mais eficiente, e a maior eficiência (71%) foi atingida por um isolado do gênero *Steinernema*.

A menor eficiência foi apresentada por *S. carpocapsae* já que as ninfas de *M. spectabilis* têm sua movimentação pelo ambiente muito reduzida e a estratégia de forrageio desta espécie de nematóide é do tipo *ambusher*, na qual o juvenil infectante se posiciona aguardando passivamente o contato como hospedeiro (LEWIS et al., 2006), o que pode explicar o fato deste isolado ter apresentado boa eficiência no teste de laboratório e não ter

mantido a alta patogenicidade em casa-de-vegetação, no qual era necessário que os JIs buscassem o hospedeiro. Os demais isolados testados são forrageadores do tipo *cruiser*, se deslocando ativamente pelo substrato em busca do hospedeiro, caso de *S. riobravis* e *S. feltiae*, ou exibem comportamento intermediário, ora se comportando como *cruiser* ora como *ambusher*, situação da maioria dos nematóides do gênero *Heterorhabditis*.

Os isolados de *S. riobravis*, *S. feltiae* e *H. amazonensis* RSC1 se mantiveram como os de maior patogenicidade em casa-de-vegetação, tal como fizeram em laboratório, sendo considerados eficientes no controle de *Mahanarva spectabilis*, confirmando a possibilidade de inserção em programas de manejo integrado dessas pragas.

## CONCLUSÃO

Os isolados *S. riobravis*, *S. feltiae* e *H. amazonensis* RSC1 são patogênicos para ninfas de *Mahanarva spectabilis*, apresentando maior virulência.

## REFERÊNCIAS

AUAD, A.M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V.; BRAGA, A.L.F.; SOBRINHO, F.S.; LÉDO, F.J.S.; PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R.B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1077-1081, 2007.

BATISTA-FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES, S. B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.309-314, 2003.

CABANILLAS, H.E. Susceptibility of the boll weevil to *Steinernema riobrave* and other entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p.188-197, 2003.

CABANILLAS, H.E.; RAULSTON, J.R. Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobravis* in corn plots. **Journal of Nematology**, v.26, p.25-31, 1994.

GEORGIS, R.; KOPPENHOFER, A.M.; LACEY, L.A.; BÉLAIR, G.; DUNCAN, L.W.; GREWAL, P.S.; SAMISH, M.; TAN, L.; TORR, P.; VAN TOL, R.W.H.M. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, v.38, p.103-123, 2006.

GREWAL, P.S.; DE NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potencial for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v.30, p.191-205, 2001.

HOLMANN, F. & PECK, D. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 275-284, 2002.

KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v.38, p.181-206, 1993.

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego, CA, USA, Academic Press, 1997. p.281-324.

KOPPENHÖFER, A.M.; COWLES, R.S.; COWLES, E.A.; FUZY, E.M.; BAUMGARTNER, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.24, p.90-97, 2002.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI Jr., A.S. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva Fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Agricultura**, v.78, p.139-148, 2002.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; BATISTA-FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.785-790, 2005.

LEITE, L.G.; TAVARES, F.M.; BUSSÓLA, R.A.; AMORIM, D.S.; AMBRÓS, C.M.; HARAKAVA, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar *et al.* 1992 em substratos orgânicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, p.337-342, 2007.

LEWIS, E.E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioural ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.38, p.66-79, 2006.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v.34, p.791-798, 2005.

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de

*Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.221-226, 2005.

MAULÉON, H.; BARRÉ, N.; PANOMA, S. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). **Experimental & Applied Acarology**, v.17, p.831-838, 1993.

NEGRISOLI Jr., A.S.; BARBOSA, C.R.C.; MOINO Jr., A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.111-116, 2008.

RAMOS-RADRÍGUEZ, O.; CAMPBELL, J.F.; RAMASWAMY, S.B. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*. **Biological Control**, v.40, p.15-21, 2007.

REIS-MENINI, C.M.R.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J & SILVA, E R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.103, 2008.

WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v.66, p.302-303, 1927.

## SEÇÃO 4

### MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DA CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS

#### RESUMO

Objetivou-se conhecer a patogenicidade de isolados de nematóides entomopatogênicos (NEPs) sobre ninfas de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) sob diferentes métodos de aplicação. Em casa-de-vegetação ninfas de quarto ou quinto instar da cigarrinha foram colocadas sobre raízes de capim-elefante e submetidas a quatro isolados de NEPs (*Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravus* e *Heterorhabditis amazonensis* RSC1) sob duas concentrações (2000 e 4000 Juvenis Infectantes/mL) e quatro métodos de aplicação (pipetador, pulverização sobre ninfas com espuma, pulverização sobre ninfas sem espuma e inseto-cadáver). Não foi constatada diferença significativa na mortalidade ninfal em função da concentração e/ou isolado utilizado. Entretanto, a eficiência foi influenciada pelo método de aplicação, com destaque para os métodos de pulverização sobre ninfas com espuma e inseto-cadáver. *Steinernema riobravus* aplicado com pulverização sobre ninfas com espuma, na concentração de 2000 NEPs/mL e *H. amazonensis* RSC1 aplicado pelo método inseto-cadáver com uma larva infectada ocasionaram mortalidade de 71 % das ninfas. Os métodos do inseto-cadáver e da pulverização de solução aquosa sobre as ninfas com espuma são os mais eficientes para o controle de *Mahanarva spectabilis*.

Palavras-chave: controle biológico, *Heterorhabditis*, *Mahanarva spectabilis*, pastagens, *Steinernema*.

#### ABSTRACT

Application Methods of Entomopathogenic Nematodes against the spittlebug - We aimed to know the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (EPNs) isolates against *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) nymphs, under different application methods. A greenhouse assay was developed in which fourth or fifth instar spittlebug nymphs were placed upon elephant grass roots and exposed to four EPNs isolates (*Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravus* e *Heterorhabditis amazonensis* RSC1) under two concentrations (2000 e 4000 Infective Juveniles/mL) and four application methods (pippeting, spray over nymphs with froth, spray over nymphs without froth, and infected-host cadaver). The concentration and the isolates do not influenced nymph mortality. However, the

efficiency was influenced by the application method, with highlight to the methods spray over nymphs with froth and infected-host cadaver. The formulations *S. riobravis* applicated with spray over nymphs with froth, at the concentration of 2000 IJs/mL and *H. amazonensis* RSC1 applicated by the method of infected-host cadaver with one infected larvae showed 71 % of nymph mortality.

Keywords: biological control, *Heterorhabditis*, *Mahanarva spectabilis*, pastures, *Steinernema*.

## INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) tem sido investigados com objetivo de serem incluídos em programas de manejo integrado de pragas de solo e de hábitos crípticos, apresentando variações na eficácia nos diversos sistemas agrícolas em que são estudados (MOLINA & LÓPEZ, 2003).

As cigarrinhas-das-pastagens, durante a fase imatura, posicionam-se na superfície do solo junto as raízes das forrageiras, sugando seiva e produzindo muco em forma de espuma que recobre o corpo da ninfa servindo de proteção contra patógenos e dessecação (PIRES et al., 2000). Em função disso, se tornam alvos potenciais para os NEPs, pois estes exploram o mesmo ambiente e são capazes de alcançar hospedeiros através de pistas químicas.

Diversas tecnologias estão disponíveis para a aplicação de nematóides entomopatogênicos no solo, desde soluções aquosas de nematóides utilizadas em pequenos terrenos ou jardins domésticos, até aplicações aéreas para cobrir grandes campos (GREWAL, 2002). Podem ser aplicados com vários equipamentos, incluindo borrifadores, pulverizadores de pressão e eletrostáticos, ficando o método escolhido vinculado ao tipo de cultura, de praga, volume e área de aplicação (GEORGIS, 1990). Pulverizar a superfície do solo é a maneira mais comum de aplicação de nematóides entomopatogênicos, sendo o tipo e a umidade do solo fatores influenciadores da movimentação dos NEPs pelo ambiente, fazendo da escolha do método com que são aplicados fator de grande importância na estratégia de controle da praga-alvo (GREWAL et al., 1994). Com algumas exceções, as aplicações foliares tendem a ser menos eficazes que as feitas sobre o solo devido à susceptibilidade dos nematóides aos raios ultravioleta e dessecação (SHAPIRO-ILAN et al., 2006).

Além dos métodos utilizando aplicadores artificiais, foi elucidado um método que usa hospedeiros infectados por nematóides que são depositados na superfície ou enterrados a alguns centímetros de profundidade no solo, de onde emergirão os juvenis infectantes (JIs)

para buscar novos hospedeiros (SHAPIRO-ILAN et al., 2001). A aplicação utilizando insetos-cadáveres infectados por nematóides entomopatogênicos é bem descrita com lagartas de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) e foi explorada recentemente contra o gorgulho da goiaba no Brasil, mostrando-se promissora (DEL VALLE et al., 2008). Pesquisas têm demonstrado que JIs emergidos de insetos-cadáveres apresentaram maior capacidade migratória, infectividade e persistência no solo em relação a JIs aplicados em suspensão aquosa (PEREZ et al., 2003; SHAPIRO-ILAN & GLAZER, 1996; SHAPIRO & LEWIS, 1999).

A cigarrinha-das-pastagens, *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) é importante praga de forrageiras e possui características durante sua fase imatura, como seu posicionamento junto às raízes, em lugares crípticos e na superfície do solo, que possibilitam seu alcance por NEPs, caracterizando-os assim como promissores controladores desta praga. Selecionando isolados contra a cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), Leite et al. (2002) e Leite et al. (2005) realizaram pulverizações em canaviais e constataram alta patogenicidade de nematóides sobre as ninfas deste cercopídeo.

Considerando a peculiaridade dos diversos métodos de aplicação e o escasso conhecimento em torno da ação de NEPs sobre cigarrinhas-das-pastagens, objetivou-se conhecer a patogenicidade de alguns isolados sobre ninfas de *M. spectabilis* em casa-de-vegetação, utilizando-se diferentes métodos de aplicação.

## MATERIAL E MÉTODOS

As ninfas de *M. spectabilis* foram oriundas da criação mantida pelo Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite em casa-de-vegetação, onde os indivíduos se desenvolvem sobre plantas de capim-elefante e braquiária como hospedeiros.

O experimento foi conduzido sobre plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cv. Pioneiro oriundas do Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite das quais obtiveram-se mudas, por meio de estacas de um nó, que foram plantadas e mantidas em copos descartáveis de 500mL em substrato de terra/esterco (1:1) e alocadas em casa-de-vegetação sob regime de irrigação por aspersão de duas vezes por dia. Durante o experimento a temperatura média foi de 21,5°C e a umidade relativa média foi 94%.

Os nematóides aplicados foram cedidos pelo Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, adicionados à criação



mantida no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite e multiplicados de acordo com metodologia proposta por Kaya & Stock (1997) e White (1927), utilizando larvas de *Tenebrio molitor* L., 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) como hospedeiro. A partir de teste prévio realizado em laboratório, selecionaram-se os quatro isolados que apresentaram maior patogenicidade às ninfas da cigarrinha. Foram eles: *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955), *S. feltiae* (Filipjev, 1934), *S. riobravis* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994 e *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 Andaló, Nguyen & Moino Jr. 2006.

A unidade experimental compôs-se de duas ninfas por planta de capim-elefante colocadas de modo que pudessem se alimentar nas raízes previamente expostas. Os tratamentos consistiram de 4 isolados de NEPs, 4 métodos de aplicação e 2 concentrações que, em esquema fatorial, totalizaram 32 tratamentos, cada um com 4 repetições (unidades experimentais). Um grupo controle foi montado com 4 repetições a fim de se confirmar que o substrato utilizado nas unidades experimentais estava isento de nematóides e, conseqüentemente, as mortes causadas por estes patógenos foram em função dos tratamentos.

Os diferentes métodos de aplicação foram realizados após 24 horas de alimentação sobre as raízes do hospedeiro, quando as ninfas já se encontravam totalmente cobertas pela espuma, exceto no método com ninfas sem espuma, como se segue:

- **Pipetador:** um volume de 2 mL de suspensão de JIs em água destilada foi aplicado com o auxílio de um pipetador automático, lateralmente à espuma formada, nas concentrações de 2000 e 4000 JIs/mL.
- **Pulverização (ninfas com espuma):** aplicaram-se 2 mL de suspensão aquosa de JIs nas concentrações de 2000 e 4000 JIs/mL, utilizando-se um borrifador para a aplicação, que foi feita diretamente sobre a espuma.
- **Pulverização (ninfas sem espuma):** neste método, as ninfas, logo que eram posicionadas nos copos com capim-elefante (sem a proteção da espuma), receberam 2 mL de solução aquosa de JIs nas concentrações de 2000 e 4000 JIs/mL, também aplicada diretamente sobre as ninfas com auxílio de borrifador.
- **Inseto-cadáver:** larvas de *T. molitor* cobertas por calcário dolomítico (PRNT 95% e MgO 15%) foram enterradas a cerca de 5 cm da superfície, ao sétimo dia após aplicação dos NEPs sobre as larvas. A cobertura de calcário funciona como proteção para que não haja dano por outros agentes, o que poderia prejudicar a emergência dos JIs. Desta forma, realizou-se tratamentos com uma e duas larvas.

As unidades experimentais foram avaliadas diariamente. As ninfas mortas foram dissecadas e observadas ao microscópio estereoscópico e, estando sua hemolinfa com nematóides, a ninfa era considerada morta por estes patógenos. Os tratamentos (isolados, concentrações e métodos) foram submetidos à análise com esquema fatorial e as médias comparadas por meio do teste de Bonferroni com auxílio do programa estatístico SAS (versão 9.2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade das ninfas não foi influenciada pelas concentrações, assim como pelos isolados, entretanto houve influencia dos métodos de aplicação, sendo os de pulverização sobre ninfas com espuma e inseto-cadáver os mais eficientes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Mortalidade ninfal média de *Mahanarva spectabilis* (%)  $\pm$  erro padrão sob os diferentes métodos de aplicação e isolados de nematóides entomopatogênicos utilizados.

Isolado*	Método de aplicação				Média geral
	Pipetador	Pulverização (com espuma)	Pulverização (sem espuma)	Inseto-cadáver	
Sc	37,5 $\pm$ 12,5 Aab	18,8 $\pm$ 11,4 Aab	0,0 $\pm$ 0,0 Aa	50,0 $\pm$ 14,2 Aab	26,6 $\pm$ 6,3 A
Sf	12,5 $\pm$ 10,5 Aab	50,0 $\pm$ 14,2 ABb	0,0 $\pm$ 0,0 Aa	31,3 $\pm$ 13,2 Aab	23,4 $\pm$ 6,3 A
Sr	18,8 $\pm$ 11,4 Aa	68,8 $\pm$ 13,2 Bb	12,0 $\pm$ 8,3Aa	56,3 $\pm$ 14,3 Aab	39,1 $\pm$ 6,3 A
Ha	18,8 $\pm$ 11,4 Aa	50,0 $\pm$ 14,2 ABa	6,3 $\pm$ 5,3Aa	50,0 $\pm$ 14,2 Aa	31,3 $\pm$ 6,3 A
<b>Média geral</b>	21,9 $\pm$ 6,3 a	46,9 $\pm$ 7,1 b	4,7 $\pm$ 3,4 a	46,9 $\pm$ 7,1 b	

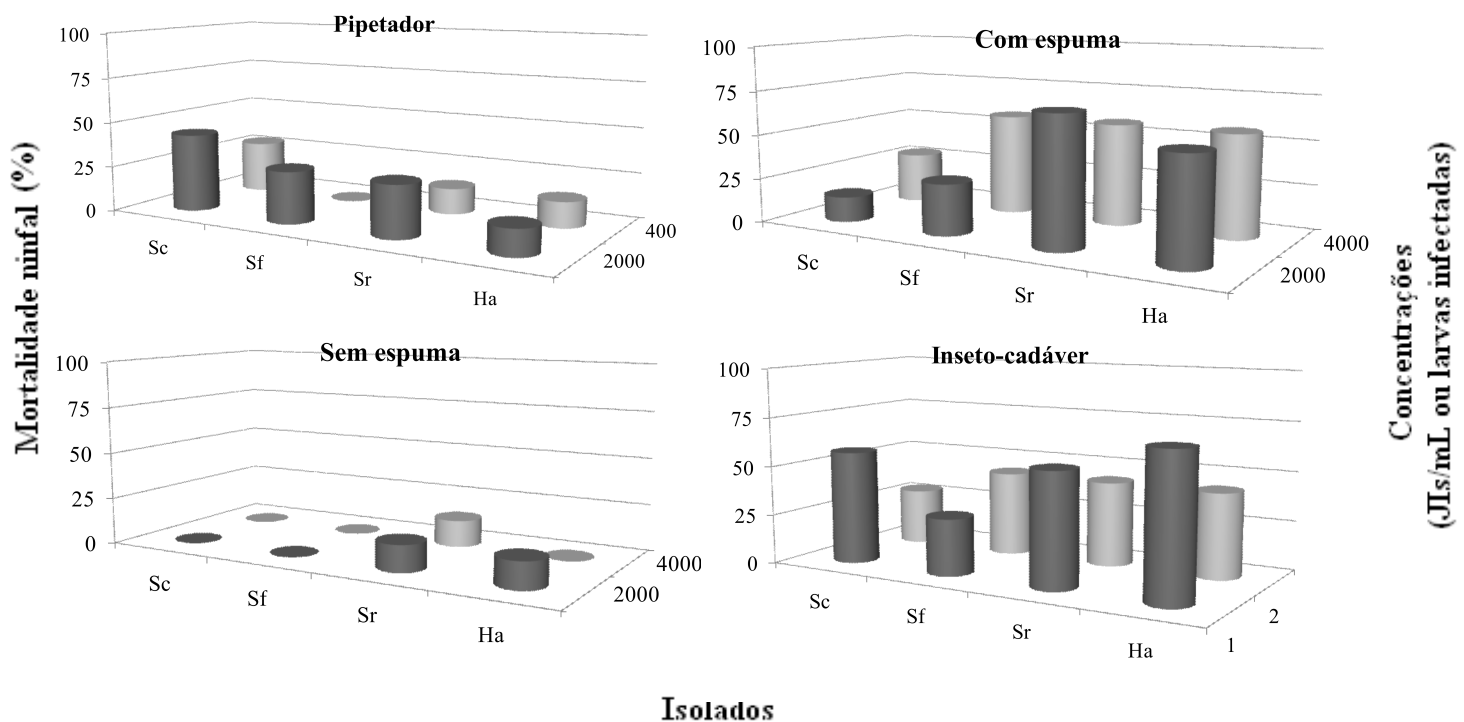
Valores seguidos de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

\*Isolados utilizados: Sc (*Steinernema carpocapsae*), Sf (*Steinernema feltiae*), Sr (*Steinernema riobravise*), Ha (*Heterorhabditis amazonensis* RSC1).

As concentrações aplicadas não diferiram estatisticamente, possivelmente pelo fato de que a menor concentração utilizada ser suficiente para atingir o maior nível de controle. Resultado semelhante foi encontrado por Leite et al. (2007) verificando que *H. indica* (IBCB-n05) pulverizado sob as concentrações de 5,7 e 22, 6 JIs/cm<sup>2</sup> não apresentou diferença estatística atingindo 75% e 85% de eficiência, respectivamente no controle de larvas de *B. mabiusi* em casa-de-vegetação. Constatação diferente foi feita por Alves et al. (2005) em que a concentração de 120 JIs/inseto foi mais eficiente no controle de larvas de

*Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) em placas de Petri do que 60 JIs/inseto.

As maiores eficiências foram obtidas com *S. riobravis* aplicado com pulverização sobre ninfas cobertas de espuma, na concentração de 2000 JIs/mL e *H. amazonensis* RSC1 aplicado através do método inseto-cadáver com uma larva infectada, sendo estas capazes de controlar 71% das ninfas, enquanto a maioria das combinações (isolado/método/concentração) apresentou eficiência intermediária, variando de 14 a 57% (Figura 1). Após a seleção do isolado mais virulento contra *M. fimbriolata* em laboratório, Leite et al. (2005) testaram a eficiência deste em campo sob diferentes concentrações, verificando que *Heterorhabditis* sp. proporcionou um máximo de 70% de controle da cigarrinha, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo.



**Figura 1.** Eficiência dos métodos de aplicação sob as diferentes formulações (concentração x isolado) sobre ninfas de *Mahanarva spectabilis* em casa-de-vegetação. Sc (*Steinernema carpocapsae*), Sf (*S. feltiae*), Sr (*S. riobravis*), Ha (*Heterorhabditis amazonensis* RSC1).

O método do inseto-cadáver foi um dos mais eficientes, alcançando 71% de mortalidade de ninfas da cigarrinha, o que pode ser explicado pelo fato de que neste método o ambiente recebe JIs recém-emergidos do hospedeiro, momento em que estes tendem a um maior deslocamento (SHAPIRO-ILAN & GLAZER, 1996), o que pode ter favorecido o encontro das ninfas pelos JIs. Além disso, a maior mortalidade ninfal atingida através desse método pode ser devida ao fato de que a espuma protetora produzida pela ninfa encontra-se

menos espessa ou até mesmo ausente sob o corpo do inseto que fica em contato com o substrato, favorecendo assim a penetração dos NEPs.

Não houve diferença significativa quando aplicadas uma ou duas larvas infectadas, possivelmente pelo fato de o volume de substrato que os nematóides percorreram até o encontro do hospedeiro ter sido pequeno o suficiente para ser explorado pelos JI emergidos de apenas uma larva infectada. Del Valle et al. (2008) encontraram resultado semelhante utilizando larvas de *G. mellonella* infectadas com nematóides, atingindo níveis de controle em torno de 50% quando empregadas 2, 4 ou 6 larvas em casa-de-vegetação, contra o gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae). O potencial de utilização de insetos-cadáver foi enfatizado quando se comparou a eficiência dos nematóides *H. indica* e *H. bacteriophora* aplicados utilizando duas larvas de *T. molitor* infectadas ou em suspensões aquosas contra duas diferentes pragas (*Diaprepes abbreviatus* (Linnaeus, 1758) e *Otiorhynchus sulcatus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae)) e para ambas constatou-se maior eficácia com o primeiro método (SHAPIRO-ILAN et al., 2003).

A aplicação utilizando pipetador representou um suposto sistema de irrigação por gotejamento, no qual os NEPs não foram aplicados diretamente sobre a espuma das ninfas de cigarrinha, tampouco se beneficiaram da pressão exercida pelo método de pulverização sobre ninfas com espuma, o que poderia auxiliar na penetração desses patógenos através da espuma protetora das ninfas, justificando assim sua baixa eficiência de modo geral.

A aplicação com pulverização sobre ninfas sem espuma apresentou baixa eficiência, chegando a ser nula para os isolados *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *H. amazonensis* RSC1 (Figura 1). Este método de aplicação foi comprometido pelo fato de grande parte das ninfas ter sido encontrada morta por fungo, provavelmente por que, uma vez desprovidas de proteção, estas ficaram mais vulneráveis aos patógenos, sendo os fungos mais rápidos na infecção das ninfas, causando sua morte antes que os NEPs aplicados pudessem fazê-lo. Isso pode ser deduzido pelo fato de que a maior parte das ninfas mortas por NEPs nos demais métodos de aplicação ter sido encontrada a partir do quarto dia de experimento e, no tratamento em que as ninfas estavam sem espuma, já no segundo dia se encontravam ninfas mortas por fungo. Observação semelhante ocorreu quando se testaram aplicações conjuntas do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* LPP39 (Metsch.) com *H. bacteriophora* JPM4, o que tornou a morte de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) mais rápida, ficando em torno de 1,8 dias para 50% e 2,8 dias para 95% da população; quando o nematóide foi aplicado sozinho, o tempo letal para 50% foi de 2,1 dias e 4,4 dias para 95% da população (ACEVEDO et al., 2007).

Esses resultados enfatizam a necessidade do conhecimento do método de aplicação ideal para a praga a ser combatida, já que estes influenciam no controle.

## CONCLUSÕES

A concentração de juvenis infetantes e os isolados de nematóides entomopatogênicos não influenciam a mortalidade das ninfas de cigarrinhas-das-pastagens.

Os métodos do inseto-cadáver e da pulverização de solução aquosa sobre as ninfas com espuma são os mais eficientes para o controle de *Mahanarva spectabilis*.

## REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interaction between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.96, p.187-192, 2007.

ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematic. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2003. p.1-34.

ALVES, L.F.A.; ROHDE, C.; ALVES, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.139-141, 2005.

DEL VALLE, E.E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E.L.S.; SOUZA, R.M.; SAMUELS, R.I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v.18, p.33-41, 2008.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R., KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 173-194.

GREWAL, P.S. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 265-288.

GREWAL, P.S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, v.19, p.245-253, 1994.

KAYA, H.K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 93-115.

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 281-324.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI Jr.; A.S. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva Fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista de Agricultura**, v.78, p.139-148, 2002.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; BATISTA-FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical entomology**, v.34, p.785-790, 2005.

LEITE, L.G.; TAVARES, F.M.; BUSSÓLA, R.A.; AMORIM, D.S.; AMBRÓS, C.M.; HARAKAVA, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar *et al.* 1992 em substratos orgânicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, p.337-342, 2007.

LEWIS, E.E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioural ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.38, p.66-79, 2006.

MOLINA, J.P.; LÓPEZ, N.J.C. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatogênicos para el control de *Hypothenemus hampei*, (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v.29, p.523-533, 2003.

PEREZ, E.E.; LEWIS, E.E.; SHAPIRO-ILAN, D.I. Impact of host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under desiccating conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.111-118, 2003.

PIRES, C.S.S.; PRICE, P.W. SUJII, E.R.; AVELAR, C. Feeding behavior of the spittlebug *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) on wild and cultivated host plants. **Environmental Entomology**, v.29, p.750-757, 2000.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; GLAZER, I. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. **Environmental Entomology**, v.25, p.1455-1461, 1996.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; GOUGE, D.H.; PIGGOTT, S.J.; FIFE, J. P. Application technology and environmental consideration for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**, v.38, p.124-133, 2006.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E. Comparisons of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. **Environmental Entomology**, v.28, p.907-911, 1999.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E.; BEHLE, R.W.; McGUIRE, M.R. Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.17-23, 2001.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E.; TEDDERS, W.L. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.83, p.270-272, 2003.

WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v.66, p.302-303, 1927.

## SEÇÃO 5

### NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS INFECTAM OVOS E ADULTOS DE CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS?

#### RESUMO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) são potenciais controladores biológicos das ninfas de cigarrinhas-das-pastagens. Com o objetivo de avaliar a eficiência dos NEPs contra as demais fases de vida (ovos e adultos) de *Mahanarva spectabilis*, desenvolveu-se experimento sob condições de laboratório. Ovos em diferentes fases de desenvolvimento embrionário foram expostas aos NEPs na concentração de 2000 JI/mL. A eficiência do patógeno foi avaliada através da dissecação dos ovos após sete dias de exposição. No experimento com adultos as unidades experimentais (UEs) consistiram de gaiolas contendo adultos da cigarrinha submetidas a uma suspensão aquosa de 8000 JI/mL de *Steinernema riobravus* (tratamento) das quais se compararam a mortalidade e número de ovos recuperados com os mesmos parâmetros das UEs livres de nematóides (testemunha). Os nematóides não foram capazes de penetrar os ovos do cercopídeo. Não foi observada morte de indivíduos adultos de cigarrinha, tampouco se observou redução no número de ovos entre as UEs tratadas e testemunhas. Não houve influência da presença de nematóides sobre a frequência de indivíduos que permaneciam sobre o substrato. Não foi caracterizada vulnerabilidade destas fases de desenvolvimento do inseto a esses patógenos, portanto, não devem ser aplicados visando o controle dessas fases de desenvolvimento do inseto.

Palavras-chave: Cercopidae, controle microbiano, *Heterorhabditis*, pastagens, *Steinernema*.

#### ABSTRACT

Can entomopathogenic nematodes infect eggs and adults of spittlebugs? - Entomopathogenic nematodes (EPNs) are potential biological controllers of spittlebugs nymphs. With the aim to evaluate the efficiency of EPNs against the other life stages (eggs and adults) of *Mahanarva spectabilis*, an assay was developed in laboratory conditions. Eggs at different embryonic development phases were exposed to the EPNs in 2000 IJ/mL concentration. The pathogens efficiency was evaluated through the eggs desiccation after seven days. The assay with adults the experimental units consisted by cages containing spittlebug adults exposed to an aqueous solution with 8000 IJs/mL of *Steinernema riobravus* (treatment), and mortality and recovered eggs number were compared with the same parameters of cages free of nematodes (control



group). Individual mortality wasn't observed, not even reduction in recovered egg number between the treated and control cages. There wasn't influence of the nematodes presence over the adults staying upon the substrate. Thus, there wasn't vulnerability in these stages of development of the insect to these pathogens, thus, it not should be applied for the control of these insect development phases.

Keywords: Cercopidae, Microbial control, *Heterorhabditis*, pastures, *Steinernema*.

## INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) da Ordem Rhabditida, famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae têm sido estudados e utilizados como controladores biológicos de diversas pragas agrícolas que vivem no solo ou possuem hábitos crípticos (GEORGIS et al., 2006, GREWAL et al., 2001). Isso ocorre devido à capacidade de buscar o hospedeiro através de pistas químicas que estes liberam naturalmente no ambiente, como gás carbônico (KAYA & GAUGLER, 1993); e à crescente demanda de implantação de programas de manejo integrado de pragas, visando diminuir o uso de produtos químicos fitossanitários, já que podem ser utilizados conjuntamente com esses produtos (KOPPENHÖFER et al 2002, NEGRISOLI Jr. et al 2008, REIS-MENINI et al 2008).

A fase de ovo é a que permanece por mais tempo no ambiente, quando estes se encontram em diapausa, paralisando o desenvolvimento até o início do período chuvoso, que coincide com a eclosão das primeiras ninfas, fazendo com que estas não tenham problemas em encontrar hospedeiros para alimentação (PECK, 2002). A ação de NEPs sobre a fase de ovo de insetos é pouco conhecida, sendo relatada no Brasil contra ovos de *Migdolus fryanus* (MACHADO et al., 2005).

As pastagens destinadas a alimentação bovina, tem como praga a cigarrinha-das-pastagens, *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) que durante a fase adulta se alimenta da seiva das folhas causando o amarelecimento destas, com conseqüente diminuição da capacidade fotossintética, prejudicando a manutenção deste cultivo. O ataque destes insetos ocorre nos meses quentes e úmidos do verão, momento em que as pastagens se recuperam da seca dos meses anteriores (AUAD et al. 2007).

A eficiência de NEPs é conhecida contra diversas pragas agrícolas (GREWAL et al., 2001). Em relação à ordem Cercopidae esses patógenos foram aplicados sobre ninfas de *M. fimbriolata*, provocando mortalidade de 100% em laboratório e 70% em campo (LEITE et al., 2005).

Em relação aos adultos de insetos sabe-se que na maioria das vezes são menos suscetíveis que as larvas à ação de NEPs (ALVES et al., 2005; RODRIGUEIRO et al., 2008). Adultos de cigarrinhas-das-pastagens realizam postura predominantemente na superfície do solo próximo à planta hospedeira; de forma endofítica (ovos colocados no interior do tecido da planta) ou ainda de forma exofítica (sobre a planta) (VALÉRIO & NAKANO, 1988). É possível que os machos que ocasionalmente caminham sobre o solo ou as fêmeas no momento da oviposição sobre o solo sejam infectadas pelos NEPs, ou ainda que a presença dos nematóides atrapalhem esse tipo de oviposição, já que a fase de vida livre (juvenis infectantes) desses patógenos explora a superfície do solo (KAYA & GAUGLER 1993). Por essa razão é possível também que os ovos sejam infectados durante o período de incubação no solo.

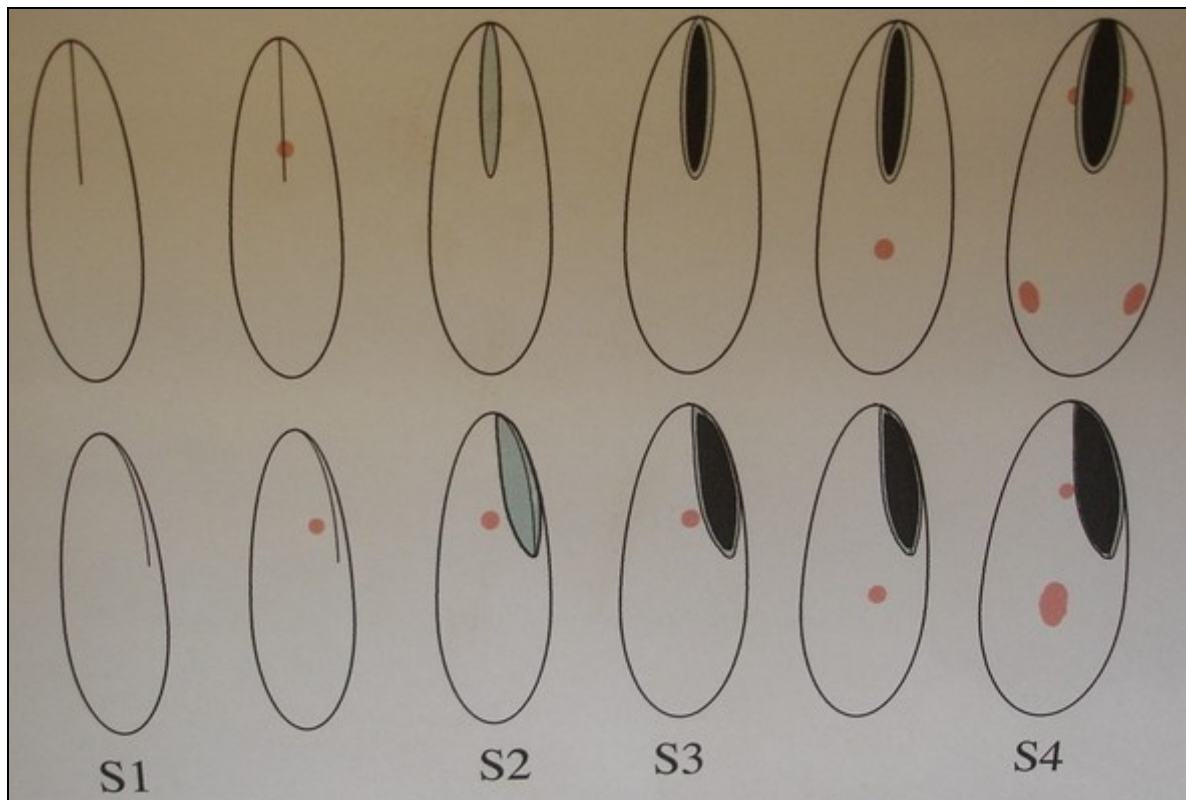
Em função da necessidade de conhecer a eficiência de nematóides entomopatogênicos contra as diferentes fases de desenvolvimento das cigarrinhas-das-pastagens, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência desses patógenos contra os ovos e adultos dessa praga.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os nematóides utilizados foram cedidos pelo Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, adicionados à criação mantida no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite e multiplicados de acordo com metodologia proposta por Kaya & Stock (1997) e White (1927), utilizando larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) como hospedeiro.

### **Penetração de NEPs em ovos de *Mahanarva spectabilis***

Utilizaram-se ovos diapáusicos (com desenvolvimento temporariamente interrompido) e não-diapáusicos em segundo (S2) e quarto (S4) estágio de desenvolvimento embrionário, assim classificados segundo Peck (2002) (Figura 1). A utilização de diferentes estágios de desenvolvimento se justifica pois, quando em S2, se apresentam totalmente envolvidos pela casca e, em S4 possuem o opérculo aberto expondo o cório, possuindo então diferenças que podem influenciar na capacidade de penetração dos patógenos.



**Figura 1.** Fases de desenvolvimento embrionário de *Mahanarva spectabilis*. (Fonte: Peck, 2002)

A unidade experimental consistiu de uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro como substrato, onde foram colocados dez ovos da cigarrinha e em seguida, com auxílio de um pipetador, adicionados 2mL de solução aquosa contendo 2000 juvenis infectantes (JIs) de cada nematóide separadamente, sendo eles: *Steinernema anomali* Kozodoi, 1984, *S. carpocapsae* (Weiser, 1955), *S. feltiae* (Filipjev, 1934), *S. riobravus* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994, *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 Andaló, Nguyen & Moino Jr. 2006, *H. amazonensis* RSC5, *Heterorhabditis* sp. JPM3, *Heterorhabditis indica* LPP1 Poinar, Karunakar & David, 1992 e *Heterorhabditis* sp. PI. Foram montados dez tratamentos (nove isolados e um controle) e para cada um destes, dez repetições. As placas foram vedadas com filme plástico e armazenadas em estufa incubadora do tipo BOD sob 25°C, 70% de UR e 12 horas de fotofase.

As unidades experimentais foram observadas diariamente a fim de se flagrar comportamentos realizados pelos nematóides e, após sete dias, avaliou-se a penetração no conteúdo dos ovos através de estereomicroscopia; sendo observados JIs no interior do ovo este foi considerado inviabilizado.

### **Infecção de adultos de *Mahanarva spectabilis* por NEPs**

Foram utilizados adultos oriundos da criação mantida pelo Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite em casa-de-vegetação, onde os indivíduos se desenvolvem sobre plantas de capim-elefante e braquiária.

A unidade experimental (UE) consistiu de uma gaiola de acrílico com dimensões de 30x55x30 cm (largura, altura, profundidade) com uma planta de capim-elefante, *Pennisetum purpureum*, (com cerca de 25cm de altura) mantida em copo descartável de 500 mL. O assoalho da gaiola e base da planta foram cobertos com seis camadas de gaze hidrófila (composta de algodão, não estéril, nove fios) umedecida que serviu como substrato de oviposição. Nessa gaiola foram adicionados nove adultos da cigarrinha, sendo seis fêmeas e três machos.

Após a adição dos adultos foi aplicado o nematóide entomopatogênico *S. riobravis* sobre as gazes sob suspensão aquosa de 8000 JI/mL num total de 20mL, com auxílio de borrifador de ponta centrífuga. Unidades experimentais (gaiolas) testemunha também foram montadas com a mesma configuração, exceto pela aplicação de NEPs. Esse procedimento foi repetido seis vezes para o grupo tratado e para a testemunha. O experimento foi conduzido à temperatura de  $25^{\circ}\pm 3C$  e umidade relativa de  $70\pm 15\%$ .

Diariamente os adultos mortos foram recolhidos e observados ao microscópio estereoscópico para verificação da presença de nematóides no seu interior que, quando constada, atribuíam-se a morte do indivíduo a esse patógeno. Após três dias as gazes foram recolhidas e os ovos recuperados de cada uma delas foram contabilizados.

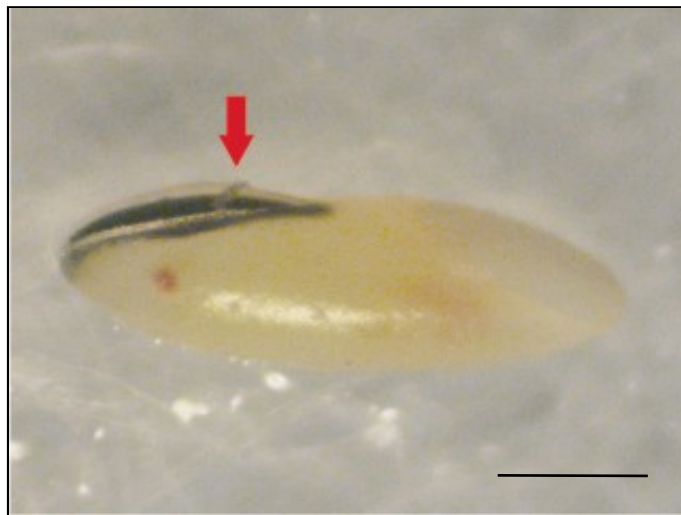
O número absoluto de adultos mortos e ovos recuperados foram comparados entre os grupos tratado e testemunha.

Adicionalmente foi contabilizada a frequência de indivíduos que permaneciam sobre a gaze. Para tal foram realizadas filmagens de duas das UEs tratadas e duas das não-tratadas, sendo duas filmagens por dia (realizadas às 12:00 e 18:00 horas), com duração de uma hora, durante três dias, tempo de desenvolvimento do experimento. O número de adultos sobre o substrato foi obtido através da amostragem tipo *scan* com intervalos de cinco minutos, totalizando 144 amostras por tratamento. Comparou-se os dados das UEs tratadas e não-tratadas e a frequência de adultos que permaneciam sobre a gaze e na parte aérea numa mesma unidade experimental, através do teste t de Bonferroni.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Penetração de NEPs em ovos de *Mahanarva spectabilis* sob condições laboratório

Observou-se que os nematóides buscaram e permaneceram ao redor dos ovos da cigarrinha-das-pastagens, desempenhando comportamentos de forrageio (forrageadores ativos e passivos) e penetração (Figura 2). No entanto, não foram capazes de penetrar nos ovos em nenhuma das fases de desenvolvimento embrionário testadas, o que se repetiu para ovos diapáusicos e não-diapáusicos, em virtude da diferença nesse caso ficar restrita a características fisiológicas e não morfológicas.



**Figura 2.** Nematóide entomopatogênico, *Steinernema carpocapsae* (seta), desempenhando comportamento de penetração em ovo não-diapáusico no quarto estágio embrionário (S4) de *Mahanarva spectabilis*. (Barra = 0,5 mm)

Com relação aos ovos em S2, acredita-se que a ausência de aberturas naturais foi determinante para o insucesso dos nematóides do gênero *Steinernema* (Travassos, 1927) já que esses invadem o hospedeiro exclusivamente por aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos). Já em ovos S4, a abertura da casca e exposição do cório não foi suficiente para que o ovo apresentasse aberturas que permitissem a penetração de nematóides desse gênero.

Para o gênero *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) a resistência da casca dos ovos foi o fator atribuído ao impedimento da penetração nos ovos em S2, já que nesse gênero os JIs possuem um dente quitinoso dorsal anterior (ADAMS & NGUYEN 2003) que é utilizado para a penetração através do tegumento do hospedeiro e, em ovos S4, o cório exposto não foi vulnerável à esse tipo de penetração. Nessa situação há também a possibilidade de as altas concentrações utilizadas terem influenciado negativamente a penetração, pois acarretaria um

aumento na competição pelos ovos como hospedeiros potenciais, maior gasto energético e consequente queda na infectividade dos NEPs (ANDALÓ, 2008, comunicação pessoal).

Em experimento conduzido a fim de avaliar a patogenicidade de *H. indica* sobre ovos de *Migdolus fryanus*, Machado et al., (2005) observaram 45% de ovos inviabilizados pelos NEPs, embora tenha se constatado que não houve reprodução destes patógenos nesta situação, com a invasão ocorrendo pela abertura natural do ovo denominada aerópila, por onde se acredita acontecer as trocas gasosas o que, além de permitir o encontro dos ovos pelos nematóides, permite também a penetração.

Dessa forma, não houve inviabilização de ovos de *Mahanarva spectabilis* pela ação dos nematóides, em nenhuma das fases de desenvolvimento embrionário testadas, de modo que não é neste momento do ciclo da cigarrinha em que estes patógenos devem ser liberados para o controle.

### **Infecção de adultos de *Mahanarva spectabilis* por NEPs**

Não foi observada morte de adultos da cigarrinha das pastagens provocada por *Steinernema riobravis*, tampouco houve diminuição da oviposição em função do tratamento (Tabela 1). Foram observados alguns indivíduos mortos com nematóides sobre o corpo, mas não dentro da hemolinfa, o que caracterizaria com segurança a morte provocada por esse patógeno. Pode-se inferir, portanto, que os nematóides reconheceram os adultos como hospedeiros potenciais, mas não foram capazes de infectá-los. Em relação às fêmeas da cigarrinha, não houve alteração do comportamento de oviposição, conseqüentemente do número absoluto de ovos recuperados, possivelmente pelo fato de serem invulneráveis a ação dos nematóides.

**Tabela 1.** Número de ovos de *Mahanarva spectabilis* recuperados das unidades experimentais (gaiolas) tratadas (com aplicação de NEPs) e testemunha (sem aplicação de NEPs).

<b>Repetições</b>	<b>Gaiolas tratados</b>	<b>Gaiolas testemunha</b>
1	234	113
2	194	143
3	151	134
4	38	260
5	30	0
6	73	76
<b>Média</b>	<b>120 a</b>	<b>121 a</b>
<b>Total</b>	<b>720</b>	<b>726</b>

Valores seguidos de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Observou-se que a média de adultos que exploraram o substrato no ambiente tratado foi de 1,58, o que configurou diferença estatística da média daqueles com o mesmo comportamento no ambiente não tratado (1,35). Isso evidencia que a presença dos nematóides no substrato não influenciou no número de indivíduos adultos que explora esse ambiente e que mesmo estando em contato com os adultos de cigarrinha, os nematóides não foram capazes de infectá-los.

Ocorreu diferença na frequência de adultos que permaneciam sobre o substrato e os que não o faziam em ambos os grupos, sendo de 1,58 e 7,42, no grupo tratado e 1,35 e 7,65 no grupo não-tratado. A baixa frequência de adultos sobre o substrato em ambas situações (no grupo tratado e não tratado) confirma as observações realizadas por Valério & Nakano (1988) para a cigarrinha *Zulia entreriana*, que constataram uma maior atividade de adultos de cigarrinha no terço superior das plantas hospedeiras.

Outra razão que possivelmente explica a ausência de infecção dos adultos pelos NEPs é que, como observado por Alves et al. (2005) e Rodrigueiro et al. (2008) estudando nematóides contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus*, a mortalidade de adultos foi menor do que de larvas, talvez pelo fato de os primeiros apresentarem tegumento mais quitinizado, resistindo melhor à penetração dos nematóides, que nesse caso ocorreria exclusivamente pelas aberturas naturais; além da habilidade de realizar comportamentos de auto-limpeza, não exibido pelas larvas, percebendo a presença dos nematóides no corpo e diminuindo assim a incidência de infecções por esses patógenos.

Embora tenham constatado que NEPs são patogênicos a adultos do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, e adultos das pragas de grãos armazenados, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) e *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae)

Cabanillas (2003) e Trdan et al. (2006), respectivamente, observaram também que a concentração letal de nematóides para o controle destes insetos nessa fase é maior que durante a fase imatura, e quando o parâmetro analisado foi a mortalidade de indivíduos, constatou-se que a fase imatura é mais suscetível que a fase adulta.

A gaze servindo como substrato de locomoção dos nematóides pode ter afetado sua capacidade de infectar os insetos, já que a granulometria do substrato exerce influência nesse processo (KOPPENHÖFER & FUZY, 2007). No presente trabalho a gaze configurou substrato com alta granulometria, com lacunas grandes entre as partículas, possivelmente fazendo com que os juvenis infectantes tendessem a se deslocar para camadas mais baixas, dificultando o contato com os hospedeiros.

## CONCLUSÃO

Nematóides entomopatogênicos não são capazes de penetrar nos ovos de *Mahanarva spectabilis* e a fase adulta não foi vulnerável a *Steinernema riobraviss*.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, 2003. p.1-34.

ALVES, L.F.A., ROHDE, C., ALVES, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 139-141, 2005.

AUAD, A.M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V.; BRAGA, A.L.F.; SOBRINHO, F.S.; LÉDO, F.J.S.; PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R.B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1077-1081, 2007.

CABANILLAS, H. E. Susceptibility of the boll weevil to *Steinernema riobrave* and other entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 188-197, 2003.

GEORGIS, R.; KOPPENHOFER, A.M.; LACEY, L.A.; BÉLAIR, G.; DUNCAN, L.W.; GREWAL, P.S.; SAMISH, M.; TAN, L.; TORR, P.; VAN TOL, R.W.H.M. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, v. 38, p. 103-123, 2006.



GREWAL, P.S.; DE NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potencial for exploration and use in South America. **Neotropical entomology**, v. 30, p. 191-205, 2001.

KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, p. 181-206, 1993.

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego, CA, USA, Academic Press, 1997. p.281-324.

KOPPENHÖFER, A.M.; COWLES, R.S.; COWLES, E.A.; FUZY, E.M.; BAUMGARTNER, L. Comparison of neonictinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 24, p. 90-97, 2002.

KOPPENHÖFER, A.M., FUZY, E.M. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 128-139, 2007.

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.221-226, 2005.

NEGRISOLI Jr., A.S.; BARBOSA, C.R.C.; MOINO Jr., A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v. 32, p. 111-116, 2008.

PECK, D.C. Distribución y reconocimiento del salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) em la Costa Caribe de Colombia. **Pasturas Tropicales**, v.24, p.4-15, 2002.

REIS-MENINI, C.M.R.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J & SILVA, E R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and na acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 103, 2008.

RODRIGUEIRO, T.S.C., GINARTE, C.M.A., LEITE, L.G., TAVARES, F.M., GOULART, R.M. & GIOMETTI, F.H.C. Eficiência de *Heterorhabditis indica* IBCB-N05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 279-284, 2008.

TRDAN, S., VIDRIH, M., VALIC, N. Activity of four entomopathogenic nematodes species against young adults of *Sitophilus granaries* (Coleoptera: Curculionidae) and *Oryzaephilus*

*surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) under laboratory conditions. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 113, n. 4, p. 168-173, 2006.

VALERIO, J.R & NAKANO, O. Locais de alimentação e distribuição vertical de adultos da cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) em plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 17, n. 2, p. 519-529, 1988.

WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v.66, p.302-303, 1927.

## SEÇÃO 6

### SELEÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)

#### RESUMO

Objetivou-se selecionar isolados de nematóides entomopatogênicos (NEPs) contra a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*. Para tal desenvolveu-se experimento em laboratório no qual ninfas da cigarrinha foram expostas a sete isolados de nematóides (*Steinernema anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravis*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC5, *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7) sob três concentrações (200, 400 e 800 NEP/ninfa). Após a seleção dos isolados mais virulentos em laboratório, desenvolveu-se experimento em casa-de-vegetação. O aumento da concentração não proporcionou incremento na mortalidade ninfal de *M. fimbriolata* em laboratório. As ninfas da cigarrinha foram susceptíveis a todos os isolados, com destaque para *S. riobravis* com 90% de mortalidade e *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, e *H. baujardi* LPP7 com 80%. O desempenho em casa-de-vegetação não foi diferente entre os isolados, com a mortalidade ninfal ficando entre 48% (*S. carpocapsae*) e 72% (*S. feltiae*). Assim, ocorre diminuição da eficiência dos nematóides em casa-de-vegetação comparada a eficiência em laboratório.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, controle microbiano, cigarrinha-das-raízes, *Heterorhabditis*, *Steinernema*.

#### ABSTRACT

Screening of entomopathogenic nematodes strains to the control of *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) - We aimed to screening entomopathogenic nematodes (EPNs) strains against the root spittlebug, *Mahanarva fimbriolata*. An assay was developed at laboratory in which nymphs of the insect were exposed to seven EPNs strains (*Steinernema anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravis*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC5, *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7) under three concentrations (200, 400 and 800 EPNs/nymph). After the laboratory screening a greenhouse assay was carried out. Increasing concentration doesn't increase nymph mortality at laboratory. The root spittlebug nymphs were susceptible to all strains, with 48% (*S. carpocapsae*) and 72% (*S. feltiae*) pathogenicity extremes. A efficiency decrease was observed in greenhouse compared with laboratory.

Keywords: *Heterorhabditis*, microbial control, root spittlebug, *Steinernema*, sugar cane.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e derivados; sendo esta a terceira maior cultura em área cultivada no país. Dos derivados, além do açúcar, destacam-se os biocombustíveis como o álcool e o biodiesel, e estes se mostram promissores à geração de energia, já que os combustíveis fósseis vêm recebendo severas críticas ambientalistas e mostram sérias restrições quanto à sua sustentabilidade (MACEDO, 2005).

Dentre as pragas da cultura da cana-de-açúcar destaca-se a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), que com a gradativa redução da prática da colheita com queima da palha e consequente expansão da colheita mecânica, teve sua população aumentada, pois a cobertura das folhas secas da planta forma um ambiente ideal para o desenvolvimento das ninfas da cigarrinha que se alimentam da seiva da raiz junto ao solo (RAVANELI et al., 2006) causando, segundo Madaleno et al. (2008), 29,8% de redução da produtividade de cana, quando numa população de 7,3 ninfas por metro linear.

O controle desta praga tem se baseado em medidas culturais como época de colheita, métodos físicos, retirando a palha; utilização de diferentes genótipos resistentes à praga, aplicação de inseticidas, controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos ou ações sinérgicas desses (ALMEIDA et al., 2003; BATISTA-FILHO et al., 2003; DINARDO MIRANDA et al., 2001; DINARDO-MIRANDA et al., 2002; SOUZA et al., 2008).

O manejo integrado de pragas preconiza a diminuição do uso de produtos químicos fitossanitários através de subdosagens e aplicações menos frequentes, devido aos problemas ambientais e econômicos que ocorrem em função do uso indiscriminado dessa prática. Com isso tem recebido maior atenção o emprego de variedades de forrageiras resistentes às cigarrinhas (AUAD et al., 2007) e a utilização de agentes de controle biológico, dos quais destacam-se os fungos entomopatogênicos entre os mais estudados, como nos trabalhos de Batista Filho et al. (2003) e Loureiro et al. (2005). Contudo, tais medidas apresentam peculiaridades acerca de sua utilização. Dessa forma, surge a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias para o manejo dessa praga.

Algumas características fazem dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) promissores controladores de pragas agrícolas, como a rapidez com que combatem o hospedeiro, a facilidade de produção em massa com baixo custo e o amplo espectro de hospedeiros susceptíveis (GEORGIS et al., 2006, GREWAL et al., 2001); possuem compatibilidade com produtos fitossanitários, podendo ocorrer inclusive ação aditiva (KOPPENHÖFER et al., 2002, NEGRISOLI Jr. et al., 2008, REIS-MENINI et al., 2008),

também são capazes de buscar hospedeiros de hábitos crípticos (KAYA & GAUGLER, 1993) como as cigarrinhas-das-raízes. No caso de *M. fimbriolata* a literatura se resume às pesquisas realizadas por Leite et al. (2002) e Leite et al. (2005), nas quais os nematóides se mostraram como potenciais agentes de controle da cigarrinha-das-raízes.

Entre os isolados de nematóides entomopatogênicos ocorrem sensíveis diferenças comportamentais, em relação à emersão a partir do hospedeiro, método de penetração, estratégia de forrageio e busca, diferenças morfológicas e fisiológicas; além de a concentração desses patógenos no ambiente e a praga a ser combatida também serem fatores que influenciam sua ação (LEWIS et al., 2006), o que explica a especificidade de cada um deles e justifica o desenvolvimento de experimentos de seleção de isolados adequados para as espécies de praga.

Dessa forma, afim de otimizar a produção de cana-de-açúcar com a implementação de programas de manejo integrado de pragas, os NEPs podem ser inseridos, já que exploram o mesmo ambiente das ninfas deste cercopídeo. Objetivou-se, portanto, avaliar a patogenicidade de diferentes isolados de NEPs contra ninfas da cigarrinha-das-raízes, *M. fimbriolata*, em condições de laboratório e casa-de-vegetação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas ninfas de *M. fimbriolata* oriundas da criação mantida pelo Laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite em casa-de-vegetação sobre plantas de cana-de-açúcar, *Saccharum* spp. cv. RB739735.

Os nematóides foram cedidos pelo Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, adicionados à criação mantida no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite e multiplicados de acordo com metodologia proposta por Kaya & Stock (1997) sobre larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) como hospedeiro. sendo estes: *Steinernema anomali* Kozodoi, 1984, *S. carpocapsae* (Weiser, 1955), *S. feltiae* (Filipjev, 1934), *S. riobravensis* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994 *Heterorhabditis amazonensis* RSC5 Andaló, Nguyen & Moino Jr. 2006, *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 Poinar 1976, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens 2003.

### **Mortalidade ninfal de *Mahanarva fimbriolata* provocada por nematóides entomopatogênicos em laboratório**

As unidades experimentais foram constituídas de placas de Petri com duas folhas de papel filtro como substrato, onde foram aplicados 2 mL de solução aquosa de NEPs (tratamentos) ou isenta destes patógenos (controle). Em seguida cinco ninfas de quarto e/ou quinto instar da cigarrinha foram colocadas em cada unidade experimental. As placas foram seladas com filme plástico e acondicionadas em estufa incubadora à temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e  $80\pm 10\%$  de umidade relativa. Os nematóides foram aplicados nas concentrações de 200, 400 e 800 NEPs/ninfa. Assim, formaram-se 21 tratamentos em esquema fatorial (7 isolados x 3 concentrações) com 5 repetições. Um grupo controle com água destilada isenta de nematóides foi formado a fim de confirmar que as ninfas não tiveram contato prévio com os patógenos e a mortalidade observada ocorreu exclusivamente em função dos tratamentos.

Após sete dias, as ninfas mortas foram dissecadas, observadas ao microscópio estereoscópico e as que apresentassem a hemolinfa contendo NEPs eram consideradas mortas por estes patógenos. A mortalidade média foi submetida à análise de variância e comparada pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

### **Mortalidade ninfal de *Mahanarva fimbriolata* provocada por nematóides entomopatogênicos em casa-de-vegetação**

Cinco ninfas de quarto e/ou quinto instar da cigarrinha foram acondicionadas na base de uma muda de cana-de-açúcar cv. RB739735 plantada em copo plástico com raízes previamente expostas e alocadas em casa-de-vegetação, que durante o experimento teve temperatura média de  $25,5\pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $94\pm 5\%$ . Após 24 horas, quando as ninfas já estavam plenamente protegidas pela espuma, os nematóides que apresentaram patogenicidade maior ou igual a 80%, no ensaio com ninfas em laboratório, foram aplicados sob a concentração de 200 JIs/ninfa em volume total de 2 mL por copo, com o auxílio de um borrifador de ponta centrífuga, sendo o jato direcionado sobre a espuma.

Dessa forma, o delineamento experimental teve quatro isolados representando os tratamentos e cinco repetições. Foi montado um grupo controle com cinco repetições a fim de se confirmar que o substrato e as ninfas utilizadas nas unidades experimentais estavam isentas de nematóides e, conseqüentemente, as mortes causadas por estes patógenos ocorreram em função dos tratamentos. A partir daí as ninfas foram acompanhadas diariamente até a emergência do último adulto e as mortas observadas ao microscópio estereoscópico para a constatação da

presença de nematóides na hemolinfa, que em caso positivo eram considerados os causadores da morte da ninfa.

Os dados de mortalidade provocada pelos isolados utilizados foi submetida à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância. Comparou-se também a mortalidade ninfal média provocada pelos NEPs utilizados nos dois ambientes (laboratório e casa-de-vegetação), através do teste Scott-Knott com 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Mortalidade ninfal de *Mahanarva fimbriolata* provocada por nematóides entomopatogênicos em laboratório**

O grupo controle não apresentou ninfas mortas por nematóides, confirmando que não houve contato prévio destas com os patógenos e os resultados foram obtidos em função dos tratamentos realizados. Todos os isolados de nematóides entomopatogênicos causaram mortalidade às ninfas de *M. fimbriolata*.

Observou-se que as concentrações utilizadas não afetaram significativamente a eficiência dos tratamentos. Pode-se afirmar que a menor delas (200 NEPs/ninfa) proporcionou nível máximo de controle, não sendo necessário acréscimo nesse número para aumento da eficiência dos nematóides. Observação semelhante foi feita por Leite et al. (2007) testando a virulência de NEPs sobre *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) (Diptera: Sciaridae) em que as concentrações de 10 e 50 JIs/cm<sup>2</sup> não tiveram diferença na mortalidade de larvas do inseto. Diferente do reportado por Vasconcelos et al. (2004) no qual apenas a maior concentração testada (1200 JIs/fêmea) foi capaz de causar redução significativa na massa de ovos produzida por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Em contrapartida, Monteiro et al. (2010) constataram que as seis concentrações testadas foram diferentes entre si em alguns parâmetros reprodutivos de *R. (B.) microplus* e semelhança em outros.

Os isolados *S. anomali*, *H. bacteriophora* HP88 e *H. amazonensis* RSC5 sob a concentração intermediária (400 NEPs/ninfa) apresentaram eficiência inferior aos demais nesta mesma concentração, o que pode refletir uma maior sensibilidade destes isolados quanto à concentração em que são aplicados. Isso se repetiu para *H. bacteriophora* HP88 nas demais concentrações, o que reflete sua eficiência significativamente inferior aos demais isolados quando se considera a média geral das concentrações aplicadas.

Independente da concentração, *S. riobravus* alcançou 90% de mortalidade de ninfas, seguido de *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *H. baujardi* LPP7 (80%); *S. anomali* (70%), *H. amazonensis* RSC5 (68%) e *H. bacteriophora* HP88 (38%), sendo este último estatisticamente inferior aos demais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Mortalidade  $\pm$  erro padrão (%) de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* mortas em cada um dos tratamentos (concentração x isolado).

Isolados*	Concentrações (NEPs/ninfa)			
	200	400	800	Média geral
<b>Sa</b>	68 $\pm$ 16 Aa	68 $\pm$ 12 Ba	76 $\pm$ 12 Aa	70 $\pm$ 8 A
<b>Sc</b>	68 $\pm$ 14 Aa	88 $\pm$ 4 Aa	84 $\pm$ 4 Aa	80 $\pm$ 6 A
<b>Sf</b>	88 $\pm$ 4 Aa	80 $\pm$ 16 Aa	72 $\pm$ 12 Aa	80 $\pm$ 6 A
<b>Sr</b>	88 $\pm$ 4 Aa	96 $\pm$ 4 Aa	88 $\pm$ 8 Aa	90 $\pm$ 4 A
<b>RSC5</b>	80 $\pm$ 16 Aa	56 $\pm$ 8 Ba	68 $\pm$ 16 Aa	68 $\pm$ 8 A
<b>HP88</b>	32 $\pm$ 10 Ba	48 $\pm$ 10 Ba	36 $\pm$ 12 Ba	38 $\pm$ 6 B
<b>LPP7</b>	72 $\pm$ 8 Aa	80 $\pm$ 8 Aa	88 $\pm$ 4 Aa	80 $\pm$ 4 A
<b>Média geral</b>	70 $\pm$ 4 a	74 $\pm$ 4 a	74 $\pm$ 4 a	

Valores seguidos de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

\*Isolados utilizados: Sa (*Steinernema anomali*), Sc (*Steinernema carpocapsae*), Sf (*Steinernema feltiae*), Sr (*Steinernema riobravus*), RSC5 (*Heterorhabditis amazonensis* RSC5), HP88 (*Heterorhabditis bacteriophora* HP88) e LPP7 (*Heterorhabditis baujardi* LPP7).

Esses dados confirmam os obtidos por Leite et al. (2005) em que os isolados *Heterorhabditis* sp. (CB-n5), *Steinernema* sp. (CB-n6) e *Heterorhabditis* sp. (CCA) apresentaram 100%, 98% e 96% de eficiência, respectivamente, quando aplicados sob a concentração de 2000 JIs/mL em condições de laboratório, mostrando assim que *M. fimbriolata* é susceptível a ambos gêneros de NEPs.

Os isolados *S. riobravus*, *S. feltiae*, *S. carpocapsae* e *H. baujardi* LPP7 foram os mais eficientes contra *M. fimbriolata* e também são promissores contra a praga do algodão (CABANILLAS, 2003), o cupim de montículo (SOUZA, 2006), o besouro cascudinho (ALVES et al., 2005) e o gorgulho da goiaba (DEL-VALLE et al., 2005), respectivamente, denotando o grande espectro de hospedeiros destes patógenos.

**Mortalidade ninfal de *Mahanarva fimbriolata* provocada por nematóides entomopatogênicos em casa-de-vegetação**



Não ocorreu diferença estatística entre a mortalidade de ninfas provocada pelos diferentes isolados de NEPs e todos apresentaram patogenicidade às ninfas de *Mahanarva fimbriolata* em casa-de-vegetação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Mortalidade  $\pm$  erro padrão de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* provocada por isolados de nematóides entomopatogênicos aplicados sob condições de casa-de-vegetação na concentração de 200 JI/ninfa.

Isolados	Mortalidade (%)
<i>Steinernema carpocapsae</i>	48 $\pm$ 5 a
<i>Steinernema feltiae</i>	72 $\pm$ 4 a
<i>Steinernema riobravis</i>	68 $\pm$ 4 a
<i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7	52 $\pm$ 2 a

Valores seguidos de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A ausência de diferença na patogenicidade entre os isolados se deve possivelmente ao fato de terem sido selecionados previamente em laboratório, sendo estes os mais virulentos. Apesar de possuírem estratégias de forrageio diferentes entre si (*cruisers* e *ambushers*) não houve diferença na ação dos isolados talvez por terem sido aplicados diretamente sobre a espuma das ninfas, minimizando a necessidade de se deslocarem em direção ao hospedeiro ou aguardar pelo contato com estes.

Após a seleção do isolado mais virulento contra *M. fimbriolata* em laboratório, Leite et al. (2005) testaram a eficiência deste em campo sob diferentes concentrações, verificando que *Heterorhabditis* sp. proporcionou um máximo de 70% de controle da cigarrinha, com as concentrações não diferindo entre si. Ambos estudos mostram a capacidade de NEPs serem empregados contra a cigarrinha-das-raízes.

Quando se analisa a influência dos ambientes sobre os isolados nota-se que foram semelhantes entre si quando se considera os ambientes isoladamente. Entretanto, quando se compara a influência dos ambientes, houve diferença significativa, sendo o desempenho dos nematóides em casa-de-vegetação inferior ao apresentado em laboratório. A mortalidade ninfal provocada pelos isolados *S. carpocapsae* e *H. baujardi* LPP7 apresentou diferença significativa entre os ambientes. (Tabela 3).

**Tabela 3.** Porcentagem  $\pm$  erro padrão da mortalidade ninfal de *Mahanarva fimbriolata* provocada por isolados de nematóides entomopatogênicos nos ambientes estudados.

	Laboratório	Casa-de-Vegetação	Média geral
<i>Steinernema carpocapsae</i>	80 $\pm$ 6 Aa	48 $\pm$ 5 Ab	64 $\pm$ 5 A
<i>Steinernema feltiae</i>	80 $\pm$ 4 Aa	72 $\pm$ 4 Aa	76 $\pm$ 4 A
<i>Steinernema riobravise</i>	90 $\pm$ 4 Aa	68 $\pm$ 4 Aa	79 $\pm$ 4 A
<i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7	80 $\pm$ 4 Aa	52 $\pm$ 2 Ab	66 $\pm$ 3 A
<b>Média geral</b>	83 $\pm$ 5 a	60 $\pm$ 4 b	

Valores seguidos de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A influencia negativa provocada pelo ambiente de casa-de-vegetação, de modo geral, ocorreu possivelmente devido a unidade experimental utilizada nos ensaios em laboratório constituir um ambiente ideal (substrato ideal para locomoção, temperatura e umidade constantes e ideais, ausência de organismos antagonistas, ausência de refúgio para os hospedeiros) para o desempenho dos nematóides; condições estas que foram suprimidas ou prejudicadas nos testes em casa-de-vegetação (semi-campo), buscando simular o ambiente natural (campo). Entretanto, dois dos isolados testados (*S. feltiae* e *S. riobravise*) mantiveram alta patogenicidade mesmo quando empregados no ambiente de casa-de-vegetação, o que permite destacá-los para utilização em ensaios de campo.

## CONCLUSÃO

Nematóides entomopatogênicos são patogênicos às ninfas de *Mahanarva fimbriolata*, com destaque para os isolados *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravise* e *Heterorhabditis* LPP7.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, 2003. p.1-34.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; & SANTOS, A. S. 2003. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom., Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 101-103.

AUAD, A.M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V.; BRAGA, A.L.F.; SOBRINHO, F.S.; LÉDO, F.J.S.; PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R.B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1077-1081, 2007.

BATISTA-FILHO, A., ALMEIDA, J. E. M., SANTOS, A. S., MACHADO, L. A., ALVES, S. B. 2003. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom: Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 309-314.

DINARDO-MIRANDA, L.L., FERREIRA, J.M.G & CARVALHO, P.A.M. 2001. Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, São Paulo, **30**: 145-149.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V. J. 2002. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal)(Hemíptera: Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 609-614.

GEORGIS, R.; KOPPENHOFER, A.M.; LACEY, L.A.; BÉLAIR, G.; DUNCAN, L.W.; GREWAL, P.S.; SAMISH, M.; TAN, L.; TORR, P.; VAN TOL, R.W.H.M. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, v.38, p.103-123, 2006.

GREWAL, P. S., DE NARDO, E. A. B., AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: potencial for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v, 30, n. 2, p. 191-205, 2001.

KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v.38, p.181-206, 1993.

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego, CA, USA, Academic Press, 1997. p.281-324.

KOPPENHÖFER, A.M.; COWLES, R.S.; COWLES, E.A.; FUZY, E.M.; BAUMGARTNER, L. Comparison of neonictinoid inseticidas as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.24, p.90-97, 2002.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI Jr., A.S. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Agricultura**, v.78, p.139-148, 2002.

- LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; BATISTA-FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.785-790, 2005.
- LEITE, L.G., TAVARES, F.M., BUSSÓLA, R.A., AMORIM, D.S., AMBRÓS, C.M., HARAKAVA, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 em substratos orgânicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 4, p. 337-342, 2007.
- LEWIS, E.E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioural ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.38, p.66-79, 2006.
- LIU, J., POINAR, G. O. & BERRY, R. E. 2000. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. **Annual Reviews Entomology**, v. 45, p. 287-306.
- LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v.34, p.791-798, 2005.
- MACEDO, I.C. **A energia da Cana-de-açúcar** – Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. Berlendis & Vertecchia. São Paulo: SP. Única – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2005. 231 p.
- MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do instituto biológico**, v.72, p.221-226, 2005.
- MADALENO, L. L., RAVANELI, G. C., PRESOTTI, L. E., MUTTON, M. A., FERNANDES O.A., MUTTON, M. J. R. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 68-73, 2008.
- MONTEIRO, C.M.O., PRATA, M.C.A., FURLONG, J., FAZA, A.P., MENDES, A.S., ANDALÓ, V., MOINO JÚNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.106, n.3, 2010.
- NEGRISOLI Jr., A.S.; BARBOSA, C.R.C.; MOINO Jr., A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.111-116, 2008.

PECK, D.C. Distribución y reconocimiento del salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) em la Costa Caribe de Colombia. **Pasturas Tropicales**, v.24, p.4-15, 2002.

RAVANELI, G. C., MADALENO, L. L., PRESOTTI, L. E., MUTTON, M. A., MUTTON, M. J. R. 2006. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 534-539.

REIS-MENINI, C.M.R.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J & SILVA, E R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.103, 2008.

SOUZA, Z.M., PAIXÃO, A.C.S., PRADO, R.M., CESARIN, L.G., SOUZA, S.R., MONTANARI, R. Produtividade agrícola de variedades de cana-de-açúcar e incidência de broca-comum e cigarrinha da raiz em canavial colhido sem queima. **Bragantia**, v. 67, n.2, p. 413-419, 2008.

VASCONCELOS, V.O., FURLONG, J., FREITAS, G.M., DOLINSKI, C., AGUILLERA, M.M., RODRIGUES, R.C.D., PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 94, p. 201-206, 2004.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico de pragas agrícolas usando patógenos é interessante sob o ponto de vista da diminuição do uso de produtos químicos, pois dessa forma não agride o ambiente, diminui os custos com controle de pragas e os problemas com saúde pública; atendendo, assim, aos preceitos do manejo integrado de pragas.

NEPs são promissores no controle de ninfas das cigarrinhas *Mahanarva spectabilis* e *M. fimbriolata* que atacam pastagens e cana-de-açúcar, respectivamente, podendo ser inseridos em programas de manejo integrados dessas pragas. As cigarrinhas podem ser controladas por NEPs, já que são susceptíveis a todos os isolados testados, tanto em condições de laboratório como em casa-de-vegetação, com destaque para os isolados *Steinernema feltiae*, *S. riobravis*, *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 e *H. baujardi* LPP7.

Entretanto, o emprego desses patógenos deve ser feito visando o controle da fase ninfal, pois os ovos em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário se mostraram invulneráveis à penetração dos nematóides, e os adultos, devido à sua distribuição vertical ocorrer predominantemente sobre as folhas das plantas, não entram em contato com os nematóides impossibilitando a infecção. Dessa forma, a aplicação desse agente de controle fica restrita aos meses de outubro a fevereiro, quando são encontradas as ninfas, fase em que os NEPs foram eficientes.

A espuma produzida pelas ninfas as protegeu contra os nematóides. Dessa forma a aplicação pode ser feita por pulverização direta sobre a espuma das ninfas, ou ainda pelo método do inseto-cadáver que consiste de larvas previamente infectadas com o patógeno enterradas no solo.

Para o emprego dos NEPs contra as cigarrinhas, pesquisas futuras são necessárias para o conhecimento de concentrações e formulações ideais, bem como a ação desses agentes de controle em situações de campo.

## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interaction between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.96, p.187-192, 2007.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; & SANTOS, A. S. 2003. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom., Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, **70** (1): 101-103.
- ALVES, L. F. A., ROHDE, C. & ALVES, V. S. 2005. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, São Paulo, **34** (1): 139-141.
- ANDALÓ, V., CAVALCANTI, R.S., MOLINA ACEVEDO, J.P., MOINO JUNIOR, A. Avaliação de substâncias na preservação de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) em diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 301-312, 2008.
- ANDALÓ, V., MOINO JÚNIOR, A., MOLINA ACEVEDO, J.P., CAVALCANTI, R.S., CARVALHO, F.A. Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematóides em condições de armazenamento, visando seu uso no controle microbiano de pragas. **Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas**, v. 31, p. 253-265, 2005.
- ARA, G.M., DE LA TORRE, M.V., REYES, A.C. Y OLGIER, R.C. Investigación alimentaria para producción bovina com ordeño en el trópico. **Revista de Investigación Veterinária de Peru**, v. 10, n. 1, p. 95-104, 1999.
- AUAD, A.M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V.; BRAGA, A.L.F.; SOBRINHO, F.S.; LÉDO, F.J.S.; PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R.B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1077-1081, 2007.
- BATISTA-FILHO, A., ALMEIDA, J. E. M., SANTOS, A. S., MACHADO, L. A., ALVES, S. B. 2003. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom: Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, **70** (3): 309-314.
- CAMPBELL, J. F. & GAUGLER, R. 1993. Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Behaviour**. 126: 3-14.

COSTA, N.L., GONÇALVES, C.A. Épocas de vedação e utilização de capineiras de capim-elfante em Porto-Velho, Rondônia. **Pasturas Tropicales**, v. 10, p. 34-37, 1988.

DEL VALLE, E.E., DOLINSK, C., SOUZA, R.M. & SAMUELS, R.I. Avaliação de metodologias de seleção para tolerância a elevadas temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 207-214, 2005.

DERESZ, F. **Utilização do capim-elfante sob pastejo rotativo para produção de leite e carne**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1999. 29p. (Circular Técnica, 54).

DINARDO-MIRANDA, L.L., FERREIRA, J.M.G & CARVALHO, P.A.M. 2001. Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, São Paulo, **30**: 145-149.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A. 2007. Estimativa do nível de dano econômico de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Bragantia**. **66** (1): 81-88.

DINARDO-MIRANDA, L. L., VASCONCELOS, A. C. M., FERREIRA, J. M. G. *et al.* 2004. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, São Paulo, **33** (6): 743-749.

GARCIA, J. F., BOTELHO, P. S. M., PARRA, J. R. P. 2006. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. **Scientia Agrícola**. Piracicaba. **63** (4): 317-320.

GREWAL, P. S., LEWIS, E. E., GAUGLER, R. & CAMPBELL, J. F. 1994. Host find behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. **Parasitology**. **108**: 207-215.

GREWAL, P. S., NARDO, E. A. B., AGUILLERA, M. M. 2001. Entomopathogenic Nematodes: Potential For Exploration and Use in South America. **Neotropical Entomology**, São Paulo, **30** (2): 191-205.

HAZIR, S. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, **27**: 181-202.

HOLMANN, F. & PECK, D. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 275-284, 2002.

JUNQUEIRA, E. D. **A cana-de-açúcar, origem e influência**. Jornal Cana. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/HistoriadoSetor.asp>>. Acesso em: 23 abr. 2008.



KAYA, H. K. & R. GAUGLER. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Reviews Entomology**. **38**: 181-206.

KOPPENHÖFER, A.M., COWLES, R.S., COWLES, E.A., FUZY, E.M., BAUMGARTNER, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 24, p. 90-97, 2002.

LARA, J.C., DOLINSK, C., SOUZA, E.F., DAHER, R.F. Effect of mini-sprinkler irrigation system on *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) infective juvenile. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p. 433-437, 2008.

LEITE, L. G.; MACHADO L. A.; AGUILLERA, M. M.; RODRIGUES, R. C. D. & NEGRISOLI-Jr, A. S. 2002. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúca, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) **Rev. Agric.** **78**: 139-148.

LEITE, L. G., MACHADO, L.A., GOULART, R. M., TAVARES, F. M., BATISTA-FILHO, A. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, São Paulo, **34** (5): 785-790.

LIU, J., POINAR, G. O. & BERRY, R. E. 2000. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. **Annual Reviews Entomology**. **45**: 287-306.

LONG, W. H., HENSLEY, S. D. Insect pests of sugar cane. **Annual Reviews**. 149-176. 1972.

LOUREIRO, A. S., BATISTA-FILHO, A., ALMEIDA, J. E. M. 2005. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, São Paulo, **34** (5): 791-798.

MACEDO, D. 2005. 87 f. Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Tese (Doutorado em Entomologia)**. ESALQ. Piracicaba.

MACHADO, F. B. P. **Brasil, a doce terra** – história do setor. Jornal Cana. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/HistoriadoSetor.asp>>. Acesso em : 23 abr. 2008.

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do instituto biológico**, v.72, p.221-226, 2005.

MAPA/SPA. 2007. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Balanco nacional de cana-de-açúcar e agroenergia. Secretaria de Produção de Agroenergia**, Brasília, 139p.

NEGRISOLI JR., A.S., BARBOSA, C.R.C., MOINO JÚNIOR, A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 111-116, 2008.

REIS-MENINI, C.M.R., PRATA, M.C.A., FURLONG, J., SILVA, E.R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 2008.

SMITH, K.A., MILLER, R.W., SIMSER, D.H. Entomopathogenic nematode bibliography: heterorhabditid and steinernematid nematodes. **South. Coop. Ser. Bull. Arkans. Agric. Exp.**, v. 370, p. 1-81, 1992.

STINGEL, E. 2005. 75 f. Distribuição espacial e plano de amostragem para a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stal., 1854), em cana-de-açúcar. **Dissertação (Mestrado em Entomologia)**. Piracicaba.

VALLE, C.B., GLIENKE, C., LEGUIZAMON, G.O.C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, v. 7, p.42-43, 1994.

XAVIER, D.F., CARVALHO, M.M., BOTREL, M.A., FREITAS, V.P., VERNEQUE, R.S. Efeito do manejo pós-plantio no estabelecimento de pastagem de capim-elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n.4, p. 1200-1203, 2001.