

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO
DA NATUREZA

Pedro Manoel de Oliveira Netto

Potencial endofítico de fungos entomopatogênicos associados a *Urochloa ruziziensis* para controle de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae)

Juiz de Fora

2023

Pedro Manoel de oliveira Netto

**Potencial endofítico de fungos entomopatogênicos associados a *Urochloa ruziziensis*
para controle de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae)**

Dissertação apresentada programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Comportamento animal

Orientador: Prof. Dr. Alexander Machado Auad
Coorientador: Dra. Michelle O. Campagnani de Mendonça

Juiz de Fora
2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira Netto, Pedro Manoel .

Potencial endofítico de fungos entomopatogênicos associados a *Urochloa ruzizensis* para controle de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) / Pedro Manoel Oliveira Netto. -- 2023. 46 f.

Orientador: Alexander Machado Auad

Coorientadora: Michelle O. Campagnani Mendonça

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2023.

1. Cigarrinha-das-pastagens. 2. Braquiária. 3. Insetos-pragas. 4. Controle Biológico. 5. Tratamento de sementes. I. Auad, Alexander Machado, orient. II. Mendonça, Michelle O. Campagnani , coorient. III. Título.

Pedro Manoel de Oliveira Netto

**POTENCIAL ENDOFÍTICO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS
ASSOCIADOS A *Urochloa ruziziensis* PARA CONTROLE DE CIGARRINHAS-DAS-
PASTAGENS (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

Dissertação apresentada programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Comportamento animal

Aprovado em 31 de Março de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexander Machado Auad - Orientador

Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Michelle Oliveira Campagnani de Mendonça

Unievrside Federal de São João del Rei

Prof. Dr. Ralph Maturano Pinheiro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Simone Alves de Oliveira Cortes

Prefeitura Municipal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Alexander Machado Auad, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ralph Maturano Pinheiro, Professor(a)**, em 31/03/2023, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Oliveira Campagnani, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Alves de Oliveira Cortes, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1204448** e o código CRC **CFD7CE82**.

Dedico este trabalho a minha mãe, meus familiares, amigos e ao meu orientador que me inspiram e me auxiliaram na realização do mestrado

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Alexander Machado Auad, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, pelos puxões de orelhas sempre na hora certa, pela disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Meu sincero obrigado.

A minha coorientadora Professora Michelle O. Campagnani de Mendonça, pela sua disponibilidade, pelo seu incentivo, pela sua disponibilidade pelo seu apoio na elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de entomologia Tiago, Bruno, Milena, pela parceria, pelas idas ao campo e por todas as risadas no laboratório.

A todos os funcionários e profissionais da Embrapa Gado de Leite pelo apoio na realização a pesquisa.

Embrapa Gado de Leite pela estrutura e fornecimento de materiais para a realização da pesquisa.

Não poderia deixar de agradecer à minha família por todo o apoio, pela força e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida acadêmica.

A Jéssica, Eliza, Moisés, pela ajuda no desenvolvimento do projeto e inscrição no mestrado que resultou nessa dissertação.

A todos os amigos e colegas que de uma forma direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos difíceis. Para não correr o risco de não enumerar algum não vou identificar ninguém, aqueles a quem este agradecimento se dirige sabê-lo-ão, desde já os meus agradecimentos.

A Universidade Federal de Juiz de Fora pela estrutura física e apoio. CAPES pelo apoio financeiro concedendo a bolsa.

“Os ignorantes, que acham que sabem tudo, privam-se de um dos maiores prazeres da vida: aprender. ” (Provérbio popular)

RESUMO

As cigarrinhas-das-pastagens são pragas que atingem as forrageiras na América Tropical, causando danos e promovendo elevadas perdas anuais na produção de leite e de carne. Geralmente combatidas com uso defensivo de inseticida; tal alternativa, pode implicar em impactos ambientais e econômicos, sendo necessário à retirada do gado do pasto durante sua aplicação. Uma das alternativas para o combate destes insetos-pragas é o uso de fungos entomopatogênicos que não geram impactos ambientais, além de não ser preciso remover o rebanho do pasto para a sua aplicação. Sendo assim, os objetivos da pesquisa foram: i- avaliar o potencial endofítico de fungos entomopatogênicos aplicados em braquiárias, por meio do tratamento de sementes, para o controle de *Mahanarva spectabilis* (Distant) e *Deois schach* (F.) (Hemiptera: Cercopidae); ii- analisar a eficiência de plantas banqueiras como meio de disseminação do fungo à campo e, iii- determinar a frequência de infecção após o armazenamento de sementes tratadas. As sementes de braquiária foram tratadas com a suspensão, contendo 1×10^8 por 30 minutos, dos fungos UFMG 11443, UFMG 11444 e *Metarhizium anisopliae*. Essas foram plantadas em vasos de 2L, e mantidas em casa-de-vegetação. Ninfas com aproximadamente 30 dias após eclodir foram utilizadas no delineamento experimental em blocos casualizados. Vinte repetições, sendo cada repetição com 10 ninfas de *M. spectabilis* e 10 ninfas de *D. schach*. O excedente de sementes tratadas foi devidamente mantidas à 22 °C e semeadas, mensalmente, por 10 meses. Ninfas dos insetos-praga foram alimentadas com as plantas advindas de sementes tratadas. Constatou-se que os fungos entomopatogênicos foram endofíticos, infectaram igualmente as espécies de cigarrinhas das pastagens *M. spectabilis* e *D. schach* nos diferentes estágios de desenvolvimento; porém, ocasionaram baixa mortalidade ninfal. O uso da técnica de planta banqueira contendo plantas advindas de sementes tratadas com os fungos entomopatogênicos foi eficiente causando mortalidade acima de 60% nas amostras coletadas no campo. Ademais, observou-se que é possível armazenar as sementes tratadas com os fungos por 12 meses.

Palavras-chave: Cigarrinha-das-pastagens; Braquiária; Insetos-pragas; Controle biológico; Tratamento de sementes

ABSTRACT

Pasture spittlebugs are pests of forage crops in Tropical America, causing damage to forage crops, and promoting high annual losses in milk and meat production. Usually fought with defensive use of insecticide; such an alternative may result in environmental and economic impacts, requiring the removal of cattle from the pasture during its application. One of the alternatives for combatting these insect-pests is using entomopathogenic fungi that do not generate environmental impacts, in addition to not having to remove the herd from the pasture for its application. Therefore, the objectives of this research were: i - to evaluate the endophytic potential of entomopathogenic fungi applied to brachiaria, using seed treatment to control *Mahanarva spectabilis* (Distant) and *Deois schach* (F.) (Hemiptera: Cercopidae); ii - to analyze the efficiency of banker plants as a means of disseminating the fungus in the field and, iii - to determine the frequency of infection after storage of treated seeds. Brachiaria seeds were treated with a suspension, containing 1×10^8 for 30 minutes, of the fungi UFMG 11443, UFMG 11444, and *Metarhizium anisopliae*, were planted in 2L pots, and maintained in a greenhouse. The surplus of treated seeds was properly conditioned at 22 °C and sown monthly for 10 months. Nymphs of the pest-insects were fed on the plants from treated seeds. It was found that the entomopathogenic fungi were endophytic, infected equally the spittlebugs species *M. spectabilis* and *D. schach* at different developmental stages; however, they caused low nymphal mortality. The use of the banker plant technique containing plants from seeds treated with the entomopathogenic fungi was efficient. Furthermore, it was observed that it is possible to store the fungus-treated seeds for 12 months.

keywords: spittlebugs; brachiaria; insect-pests; biological control; seed treatment

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, UFMG 11443, UFMG 11444 presentes nas folhas de *Urochloa ruzizienses* com 45 dias de idade (A). Presença dos fungos entomopatogênicos nas plantas advindas de sementes tratadas ao longo do tempo (B)43
- Figura 2 – Indivíduos de *M. spectabilis* e *D. schach* alimentados com plantas infectadas com os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, UFMG 11443, UFMG 11444 (A). Adultos e ninfas com presença dos fungos entomopatogênicos (B). Mortalidade das cigarrinhas-das-pastagens (C). Adultos mortos infectados após se alimentarem da planta contendo os fungos entomopatogênicos (D)44
- Figura 3 – Adultos mortos de *M. spectabilis* coletados em campo infectados com os fungos entomopatogênicos..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Frequência de infecção de fungos endofítico nos tecidos das plantas de <i>U. ruzizensis</i> ou em ninfas de <i>M. spectabilis</i> quando alimentadas de plantas advindas de sementes estocada por 12 meses, após o tratamento das sementes com fungos endofíticos.....	42
----------	--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2: POTENCIAL ENDOFÍTICO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A <i>Urochloa ruziziensis</i> PARA CONTROLE DE CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) ¹	18
RESUMO	18
ABSTRACT	19
Introdução	20
Material e Métodos	22
ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS	28
Resultados	29
FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO E PERSISTÊNCIA DOS FUNGOS NOS TECIDOS VEGETAIS	29
ISOLAMENTO DOS FUNGOS NAS CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS E MORTALIDADE DO INSETO-PRAGA EM CASA DE VEGETAÇÃO	30
ISOLAMENTO DOS FUNGOS NAS CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS E MORTALIDADE DO INSETO-PRAGA EM CONDIÇÕES DE CAMPO	30
ANÁLISE DA PERSISTÊNCIA DOS FUNGOS NOS TECIDOS DE <i>U. ruziziensis</i> E INFECÇÃO EM <i>M. spectabilis</i> , EM PLANTAS DE DIFERENTES IDADES	31
Discussão	32
Referências Bibliográficas	37

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O surgimento de espécies forrageiras com uma alta adaptabilidade ao clima e baixa fertilidade do solo promoveu a expansão da criação de gado no Brasil, que utiliza pastagens cultivadas como principal fonte de alimento para o rebanho. Em relatório recente, publicado em 2021, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) apontou a perda de 40% da produção agrícola devido à ocorrência de pragas, que ameaçam o bem-estar vegetal (PERON, 2004; FAO, 2022).

Os insetos conhecidos como cigarrinhas das pastagens, pertencentes aos gêneros *Mahanarva* e *Deois* (Hemiptera: Cercopidae), constituem-se insetos-praga que causam danos severos a diversas espécies de gramíneas relevantes economicamente em termos nacionais e globais, como o *Pennisetum purpureum* Schumacher, 1827 (Capim elefante), *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar), e *Urochloa ruziziensis* Germain e Evrard, 1953, denominado como Capim braquiária. Estima-se que as cigarrinhas causem um prejuízo de cerca de 2 bilhões de dólares por ano no mundo (SILVA, 2019).

As cigarrinhas danificam as plantas ao se alimentarem diretamente da seiva do xilema, causando um efeito amarelado por falta de seiva e prejudicando o desenvolvimento das plantas. Ademais, durante o ato de sugar, as várias espécies de cigarrinhas injetam toxinas nas plantas promovendo a morte celular, e com isso, ocorre o amarelecimento, e o consequente secamento completo das folhas. As pastagens, conseqüentemente, sofrem significativa redução no volume de matéria seca produzida, incluindo a queda na qualidade nutricional e na palatabilidade da forragem produzida (VALÉRIO, 2006; FAZOLIN et al., 2016).

Desde os primórdios da agricultura, a humanidade tem utilizado substâncias biogênicas e inorgânicas para proteger e aumentar o rendimento de suas culturas. No entanto, a síntese e o uso desenfreado de pesticidas e fertilizantes químicos, exigida pela industrialização dos cultivos no século passado causou estragos na saúde e integridade dos ecossistemas, incluindo seus habitantes. Dada à sua capacidade de infectar simultaneamente insetos do solo e promover o crescimento e a produtividade das plantas, o fungo *Metarhizium* spp. foram considerados ambientalmente como alternativas seguras ao uso desses produtos (STONE; BIDOCHKA, 2020). Da mesma forma, há muito a se reconhece que plantas e microrganismo coexistem em uma relação simbiótica, sendo em alguns casos conhecidos por fornecerem benefícios uns aos outros em uma interação mutualística. Alguns desses microrganismos proveem tecnologias que podem e têm sido usadas como produtos comerciais (CARADUS; JOHNSON, 2020).

Para o enfrentamento das cigarrinhas-das-pastagens as alternativas disponíveis de controle são o químico, biológico, cultural, ecologia química, resistência de plantas (RESENDE et al., 2013), apesar de serem eficientes, cada um tem suas limitações.

O biocontrole clássico pode ser definido como a introdução intencional de um aliado exótico coevoluído, agente para estabelecimento permanente e controle de pragas de longo prazo. A produção agrícola deve aumentar significativamente em breve para atender às necessidades do rápido aumento da população humana. Uma das formas de ampliar significativamente a disponibilidade de alimentos é reduzir os danos às colheitas causados por insetos pragas. Apesar das medidas exaustivas de proteção à cultura, aproximadamente 10% da produção agrícola são destruídos globalmente por pragas antes da colheita (OMKAR, 2016).

Para atender à demanda mundial de alimentos, há uma necessidade crescente de práticas sustentáveis de manejo de pragas. Este significa que requer mudanças fundamentais das práticas atuais. Além disso, é necessário adotar práticas de manejo de pragas com uma dependência marcadamente reduzida de pesticidas. Uma possível solução são os sistemas de plantas banqueiras como parte da engenharia ecológica (ZHENG et al., 2017).

O controle microbiano de insetos-pragas, que implica na introdução de fungos entomopatogênicos, visa a interrupção da proliferação das cigarrinhas-das-pastagens, sem a necessidade de intervalos de aplicação, ou a retirada do gado da pastagem (EPAGRI, 2018). Campagnani et al. (2017) ressaltam que o controle biológico desse inseto-praga ainda é pouco utilizado, em parte devido à falta de diversidade de patógenos comercializados eficazes contra esses insetos em pastagens. Os fungos entomopatogênicos podem ser usados para suprimir populações de insetos por meio de liberações inundativas e inoculativas, sendo aplicados com sucesso para controlar algumas espécies de cigarrinhas em pastagens e cana-de-açúcar. Contudo, o principal problema do uso deste recurso é a dependência de fatores climáticos ideais após a pulverização, além de sua instabilidade quanto aos raios ultravioletas.

De acordo com Azevedo et al. (2000), quando um microrganismo passa por um período da sua vida no interior de alguma planta pode ser considerado como endófito. A endofítia começou a ser relatada na literatura por volta dos anos 80 demonstrando que os fungos poderiam ser microrganismo endofítico e ter um papel importante dentro dos tecidos das plantas, sendo que a presença deles dentro da planta pode desencadear respostas de proteção que vão reduzir o ataque de insetos.

Hoje em dia a endofítia vem sendo descrita com uma forma de utilização para o crescimento, melhoria na agricultura, nutrição das plantas. Entre as vantagens está a interação microrganismo-planta e a proteção contra insetos-pragas. Os microrganismos mais utilizados

como endofíticos são as bactérias e os fungos. Atualmente tem sido realizada pesquisas com os fungos endofíticos, utilizados para o controle de ataques de insetos em plantas, pois a endofítia tem a capacidade de infectar todas as partes da planta hospedeira (BARÃO e RABELO, 2022)

Nesse contexto, além da adoção de fungos no controle biológico de pragas, as unidades de criação aberta distribuem plantas infestadas de herbívoros ou carregadas de outros alimentos, como pólen ou fungos endofíticos. O método tem sido amplamente investigado ao longo de muitos anos e usado para auxiliar no estabelecimento, desenvolvimento e dispersão de organismos benéficos ao controle biológico. As plantas banqueiras atuam de modo direto ou indireto, fornecendo recursos como, presas ou hospedeiros e alimentos para inimigos naturais que são deliberadamente adicionados num sistema de cultivo, com vistas ao auxílio na reprodução e manutenção das comunidades desses inimigos naturais próximos da cultura, fornecendo o controle da praga específica (HUANG, 2011; ANDORNO; LOPEZ, 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDORNO, A. V.; LÓPEZ, S. N. Biological control of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) through banker plant system in protected crops. **Biological Control**, Atlanta, v. 78, p. 1–9, 2014.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic journal of biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.
- Baron, N. C.; Rigobelo, E. C. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, v. 13, p. 39–55, 2022.
- CAMPAGNANI, M. O. Prospection and Fungal Virulence Associated with *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in an Amazon Silvopastoral System. **Florida Entomologist**, Lutz, FL, v. 100, n. 2, p. 425-432, 2017.
- CARADUS, J. R.; JOHNSON, L. J. Epichloë Fungal Endophytes—From a Biological Curiosity in Wild Grasses to an Essential Component of Resilient High Performing Ryegrass and Fescue Pastures. **Journal of Fungi**, Basel, Switzerland, v. 6, p. 1-44, 2020.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. EPAGRI. Manejo integrado de pragas em pastagens Ênfase em pragas-chave das gramíneas perenes de verão. **Boletim Técnico EPAGRI**, Florianópolis, n. 185, p. 1-55, 2018.
- FAO. **Mudança climática influencia na perda da produção agrícola para pragas, conclui estudo apoiado pela FAO**. 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1411810/>. Acesso em: 25 jan. 2022.
- FAZOLIN, M. *et al.* **Cigarrinhas-das-pastagens**: como identificar e controlar a principal praga das pastagens. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2016. 1 folder.
- HUANG, N. *et al.* The Banker Plant Method in Biological Control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, FL, v. 30, p. 259–278, 2011.
- OMKAR, B. K. Biocontrol of Insect Pests. In: OMKAR, B. K. *Ecofriendly pest management for food security*. Oxford: Elsevier, 2016. p. 25-61
- PERON, Antônio José; EVANGELISTA, Antônio Ricardo. Degradação de pastagens em regiões de cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 655-661, 2004.
- SILVA, J. D. C. **Manejo ecológico da cigarrinha das raízes *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) em cana-de-açúcar**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
- STONE, L. B. L.; BIDOCHKA, M. J. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 104, p. 9935–9945, 2020.

VALÉRIO, J. R. **Considerações sobre a morte de passtagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em alguns Estados do Centro e Norte do Brasil:** Enfoque entomológico. Comunicado Técnico. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2006.

ZHENG, X. *et al.* Use of banker plant system for sustainable management of the most important insect pest in rice fields in China. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 1-8, 2017.

CAPÍTULO 2: POTENCIAL ENDOFÍTICO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A *Urochloa ruziziensis* PARA CONTROLE DE CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)¹

RESUMO

As cigarrinhas-das-pastagens são pragas que atingem as forrageiras na América Tropical, causando danos e promovendo elevadas perdas anuais na produção de leite e de carne. Uma das alternativas para o combate destes insetos-pragas é o uso de fungos entomopatogênicos que não geram impactos ambientais. Sendo assim, os objetivos da pesquisa foram: i- avaliar o potencial endofítico de fungos entomopatogênicos aplicados em braquiárias, por meio do tratamento de sementes, para o controle de *Mahanarva spectabilis* (Distant) e *Deois schach* (F.) (Hemiptera: Cercopidae); ii- analisar a eficiência de plantas banqueiras como meio de disseminação do fungo à campo e, iii- determinar a frequência de infecção após o armazenamento de sementes tratadas. As sementes de braquiária foram tratadas com a suspensão, contendo 1×10^8 por 30 minutos, dos fungos UFMG 11443, UFMG 11444 e *Metarhizium anisopliae*. Essas foram plantadas em vasos de 2L, e mantidas em casa-de-vegetação. O excedente de sementes tratadas foi devidamente mantidas à 22 °C e semeadas, mensalmente, por 10 meses. Ninfas dos insetos-praga foram alimentadas com as plantas advindas de sementes tratadas. Constatou-se que os fungos entomopatogênicos foram endofíticos, infectaram igualmente as espécies de cigarrinhas das pastagens *M. spectabilis* e *D. schach* nos diferentes estágios de desenvolvimento; porém, ocasionaram baixa mortalidade ninfal. O uso da técnica de planta banqueira contendo plantas advindas de sementes tratadas com os fungos entomopatogênicos foi eficiente causando mortalidade acima de 60% nas amostras coletadas no campo. Ademais, observou-se que é possível armazenar as sementes tratadas com os fungos por 12 meses.

Palavras-chaves: Braquiária; Controle biológico; Insetos-pragas; Plantas banqueiras;

Tratamento de sementes

¹Este artigo foi escrito de acordo com as normas da revista Florida Entomologist, para qual foi submetido.

ABSTRACT

Pasture spittlebugs are pests of forage crops in Tropical America, causing damage to forage crops, and promoting high annual losses in milk and meat production. One of the alternatives for combatting these insect-pests is using entomopathogenic fungi that do not generate environmental impacts. Therefore, the objectives of this research were: i - to evaluate the endophytic potential of entomopathogenic fungi applied to brachiaria, using seed treatment to control *Mahanarva spectabilis* (Distant) and *Deois schach* (F.) (Hemiptera: Cercopidae); ii - to analyze the efficiency of banker plants as a means of disseminating the fungus in the field and, iii - to determine the frequency of infection after storage of treated seeds. Brachiaria seeds were treated with a suspension, containing 1×10^8 for 30 minutes, of the fungi UFMG 11443, UFMG 11444, and *Metarhizium anisopliae*, were planted in 2L pots, and maintained in a greenhouse. The surplus of treated seeds was properly conditioned at 22 °C and sown monthly for 10 months. Nymphs of the pest-insects were fed on the plants from treated seeds. It was found that the entomopathogenic fungi were endophytic, infected equally the spittlebugs species *M. spectabilis* and *D. schach* at different developmental stages; however, they caused low nymphal mortality. The use of the banker plant technique containing plants from seeds treated with the entomopathogenic fungi was efficient. Furthermore, it was observed that it is possible to store the fungus-treated seeds for 12 months.

Keywords: brachiaria; biological control; insect-pests; banker plants; seed treatment

Introdução

O Brasil conta, atualmente, com o maior rebanho do mundo, sendo o principal exportador de carne bovina (Embrapa, 2021) e o terceiro na produção de leite (Brasil, 2022). De acordo com o IBGE (2020), a cobertura de pastagens naturais no Brasil teve uma redução de 17,9%, de 57.633.189 ha em 2006, para uma superfície de 47.323.399 ha em 2017. Já a ocorrência de pastagens plantadas aumentou em 9,5%, o que representa um acréscimo de 9.765.275ha, com destaque para a Região Norte, que experimentou forte expansão da pecuária bovina. Contudo, apesar dos esforços empreendidos na expansão do cultivo, a morte de cultivares de capim *Urochloa* spp. (Hochst. ex A. Rich.) R. D. Webster = *Brachiaria* spp. (Hochst. ex A. Rich Stapf), em virtude da ocorrência de pragas, tem sido descrita na literatura como fator de impacto negativo ao crescimento da pecuária nacional (Dias Filho, 2017).

Resende et al. (2013) destacam as cigarrinhas-das-pastagens como as principais pragas em gramíneas forrageiras na América Tropical. Durante o ato de sugar, as várias espécies de cigarrinhas, dentre elas *Mahanarva spectabilis* (Distant) e *Deois schach* (F.) (Hemiptera: Cercopidae), injetam toxinas nas plantas promovendo a morte celular, e com isso, ocorre o amarelecimento, e o conseqüente secamento completo das plantas (Fazolin et al. 2016). As pastagens conseqüentemente, sofrem significativa redução no volume de matéria seca produzida, incluindo a queda na qualidade nutricional e na palatabilidade da forragem produzida (Valério, 2009). Os problemas causados às pastagens pelo ataque anual desse inseto-praga são recorrentes, reduzindo drasticamente a produção e a qualidade das pastagens de forragens suscetíveis, promovendo cerca de 2 bilhões de dólares de prejuízo/ano no mundo (Silva, 2019).

Para mitigar o problema promovido pelas cigarrinhas das pastagens na literatura são encontradas algumas estratégias, centradas nos mecanismos de resistência das plantas (Valverde, 2006; Auad et al. 2007; Valle et al. 2009; Congio et al. 2012; Resende et al. 2013; Silva et al. 2017b; Paladini et al. 2018; Alvarenga et al. 2019; Congio et al. 2020); a

diversificação das pastagens na propriedade com a inclusão de gramíneas resistentes às cigarrinhas-das-pastagens (Alvarenga et al. 2019); o uso de compostos de origem vegetal (Dias et al. 2019; Nascimento et al. 2021) e de fungos entomopatogênicos (Campagnani, et al. 2017; Pereira et al. 2018; Pitta et al. 2019; Ribeiro; Cazarotto, 2019). Porém, esse último tem séria limitação, devido à dependência de fatores abióticos como alta incidência de raios UV e baixa umidade, os quais estão diretamente relacionados à eficiência no controle das cigarrinhas-das-pastagens (Pucheta et al., 2006). Dessa forma, é importante considerar que algumas espécies de fungos vivem em endofítia, o que pode amenizar a referida instabilidade a fatores abióticos. Baseado no contexto supracitado, este estudo hipotetiza-se que fungos com potencial endofítico, para o controle das cigarrinhas-das-pastagens, podem reduzir os problemas das exigências quanto aos fatores climáticos os quais são acometidos.

Ressalta-se também que, além da forma natural os agentes de controle biológico podem ser introduzidos por meio de pulverizações, tratamentos de sementes, e uso de plantas banqueiras. As plantas banqueiras são estabelecidas e manejadas adjacentes às lavouras, podendo atrair agentes benéficos. O método tem sido amplamente investigado ao longo de muitos anos e usado para auxiliar no estabelecimento, desenvolvimento e dispersão de organismos benéficos ao controle biológico de pragas. As plantas banqueiras atuam de modo direto ou indireto, fornecendo recursos como, presas ou hospedeiros e alimentos para inimigos naturais que são deliberadamente adicionados num sistema de cultivo, com vistas ao auxílio na reprodução e manutenção das comunidades desses inimigos naturais próximos da cultura, fornecendo o controle da praga específica (Huang, 2011; Andorno; Lopez, 2014). Baseado nesse sistema hipotetizou-se que a inclusão de plantas advindas de semente tratadas com fungos entomopatogênicos, com provável endofítia, reduzirão a população de adultos das cigarrinhas das pastagens no campo.

Ademais, a manutenção da viabilidade e da presença de fungos endofíticos nas sementes são estratégias a serem pesquisadas no processo de armazenamento de sementes, considerando que

em um programa de melhoramento de forrageiras, o armazenamento das sementes consiste em seleção de matérias com características desejáveis ao longo de tempo.

Sendo assim, os objetivos da pesquisa foram: i- avaliar o potencial endofítico de fungos entomopatogênicos aplicados em braquiárias, por meio do tratamento de sementes, para o controle de *Mahanarva spectabilis* (Distant) e *Deois schach* (F.) (Hemiptera: Cercopidae); ii- analisar a eficiência de plantas banqueiras como meio de disseminação do fungo à campo e, iii- determinar a frequência de infecção após o armazenamento de sementes tratadas.

Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido em casa de vegetação na sede da Embrapa Gado de Leite e no Campo Experimental José Henrique Bruschi- CEJHB (21°33'23.7"S 43°16'09.2"W Coronel Pacheco – MG) Brasil. Etapas relativas à obtenção e confirmação das espécies de fungos entomopatogênicos foram conduzidos na Universidade Federal de São João Del Rei.

ORIGEM DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E DAS SEMENTES DE *U. ruzizensis*

Os fungos UFMG 11443 e UFMG 11444 foram cedidos pelo Departamento de Engenharia de Biosistemas (DEPEB), da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). Aquela da espécie *Metarhizium anisopliae* foram adquiridas de forma comercial. As sementes utilizadas foram adquiridas de forma comercial da Empresa SOESP (Sementes Oeste Paulista), Safra 2021.

INOCULAÇÃO DOS FUNGOS NA SEMENTE

Para cada espécie de fungo foi usado 100g de semente. Após a pesagem das sementes foi realizada a desinfestação superficial lavando as sementes em hipoclorito (2%) por dois minutos, e em seguida um minuto em álcool 70%, após estas etapas as sementes foram enxaguadas com água destilada. Para realizar a inoculação do fungo foi preparada uma suspensão contendo 1×10^8 conídios/mL e 0,05% de Tween 80, como agente tensoativo de cada fungo separadamente, mais a suspensão controle sem a presença dos fungos, totalizando 4 tratamentos. As sementes ficaram em contato com a suspensão por 30 minutos.

CULTIVO DE *U. ruzizensis* CONTENDO FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Dez sementes de *U. ruzizensis* tratadas com fungos entomopatogênicos foram depositadas em cada vaso (2L), preenchidos com solo obtido no campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), e foram cobertas com vermiculita. Os vasos contendo as sementes foram irrigados, de forma automática, três vezes ao dia, durante 15 minutos. Após 45 dias, foi realizada a primeira poda, deixando as plantas com 15 cm de altura.

OBTENÇÃO DOS INSETOS-PRAGA

Adultos de *M. spectabilis* e *D. schach* foram coletados no campo experimental (CEJHB), com rede entomológica. Esses foram acondicionados em gaiolas entomológicas, no Laboratório de Entomologia na sede da Embrapa Gado de Leite. Após cinco dias, os ovos das duas espécies-praga foram coletados seguindo a metodologia de Auad et al. (2007). Em seguida, cinquenta ovos de cada espécie foram colocados nas plantas, sem a presença de fungos, na casa-de-vegetação e cobertos com *voil* para evitar a fuga das ninfas após a eclosão. Infestou-se 40 vasos,

totalizando 2000 ovos/espécie. Após 35 dias, as ninfas obtidas nesses vasos foram utilizadas nos experimentos.

EXPERIMENTOS:

EXPERIMENTO 01. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE INFEÇÃO E PERSISTÊNCIA DOS FUNGOS NOS TECIDOS VEGETAIS

Sementes de *U. ruziziensis* foram tratadas com fungos entomopatogênicos: UFMG 11443, UFMG 11444 e *Metarhizium anisopliae* - MA (linhagem comercial) mais o grupo controle, sem a presença de fungos. As sementes foram plantadas em vasos de 2L, e mantidas em casa-de-vegetação.

Uma amostra de tecido vegetal (folha superior) foi retirada em pontos aleatórios de plantas de quinze vasos, totalizando 60 amostras de folhas (1 amostra x 4 tratamentos x 15 vasos/repetição) com 45, 120 e 150 dias após a semeadura. Estas folhas foram alocadas em plásticos estéreis, colocadas em uma caixa térmica e levadas para realização dos testes no Laboratório de Microbiologia (DEPEB) da UFSJ. Cada folha foi desinfestada na superfície por imersão em etanol a 70% (1 min) e hipoclorito de sódio a 2% (1 min), seguido de lavagem com água destilada estéril (2 min) (Carvalho et al. 2012; Ferreira et al. 2017). Após a desinfecção, um fragmento de cada folha foi alocado em placa de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 7 dias em câmara climatizada tipo BOD. Para verificar a presença do fungo inoculado, a macromorfologia e micromorfologia dos fungos presentes nos fragmentos, foram comparadas à dos fungos UFMG 11444 e UFMG 11443 e a do *Metarhizium anisopliae* (comercial). A identificação das espécies dos fungos foi realizada com o auxílio de chaves de identificação de acordo com Alves et al. (1998).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com as plantas advindas de sementes tratadas com os diferentes fungos ou aquelas não tratadas (controle). Os tratamentos foram representados pelas folhas coletadas aleatoriamente de cada vaso, para a análise da frequência de infecção dos fungos aplicados. Adotou-se a confirmação da endofítia, quando mais de 60% das amostras apresentaram as características dos fungos aplicados.

EXPERIMENTO 2: EFICÁCIA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO, APLICADOS VIA SEMENTE, PARA O CONTROLE DE *M. spectabilis* e *D. schach* EM CASA DE VEGETAÇÃO

O delineamento experimental foi totalmente casualizados em esquema fatorial (4x2) constituído por sementes tratadas com fungo MA (comercial) ou com o fungo UFMG 11443 e com fungo UFMG 11444; além do tratamento controle e, duas espécies de cigarrinha das pastagens, *M. spectabilis* ou *D. schach*, com 10 repetições por tratamento, totalizando 80 vasos.

Em cada vaso foram colocadas 10 ninfas de cada espécie. Os dados de mortalidade (%) ninfal nos diferentes tratamentos foram utilizados para o cálculo da eficiência dos fungos em bioensaio em casa de vegetação. Diariamente, por um período de 10 dias, as ninfas mortas e os adultos ainda vivos foram retirados, acondicionados em Eppendorff[®] de 1,5 mL, devidamente identificado quanto ao tratamento.

As amostras de ninfas e/ou adultos de cigarrinhas-das-pastagens, foram coletadas e armazenados em Eppendorfs estéreis para análise de *causa mortis* e alocados em caixas térmicas. O material coletado foi levado ao Laboratório Engenharia de Biosistemas (DEPEB) do Departamento de Bioengenharia da UFSJ para incubação em meios de cultura, seletivos para fungos (Ágar Sabouraud Dextrose, Kasvi[®]) para avaliar a presença dos fungos nas ninfas e adultos de cigarrinhas das pastagens, aqueles aplicados no tratamento das sementes de braquiária.

Foram realizadas a desinfestação superficial dos insetos com hipoclorito de sódio 2% e álcool 70%. As amostras foram alocadas individualmente em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. Após, 7 dias em câmara climática tipo BOD a 25°C, para crescimento micelial, foi realizado o microcultivo e, posterior microscopia para a identificação dos fungos.

Todos os isolados de fungos filamentosos tiveram as colônias fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com suas características macromorfológicas como cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso), aspecto da borda e tempo de crescimento. Estes isolados foram comparados com a macromorfologia e micromorfologia dos fungos aplicados e analisados de acordo com a chave taxonômica de Alves et al. (1998).

EXPERIMENTO 3: EFICÁCIA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS APLICADA VIA SEMENTES E UTILIZADA EM PLANTAS BANQUEIRAS PARA O CONTROLE DE *M. spectabilis* EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Foi realizado na casa-de-vegetação o plantio de dez sementes de *U. ruziziensis* tratadas com fungos entomopatogênicos (fungo MA (comercial), o fungo UFMG 11443 e UFMG 11444) e sementes, do grupo controle, sem nenhum tipo de fungo. Em seguida, foram levados 10 vasos de cada tratamento mais o grupo controle para o campo experimental e, acondicionados em touceiras de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com comprovado ataque de *M. spectabilis* (para comprovação do ataque foi realizado rastreio e busca visual de espumas contendo ninfas nas bases das plantas). Os vasos foram colocados em linha reta com uma distância de cinco metros entre eles.

A cada sete dias, por um período de três semanas, foi avaliado o número de cigarrinhas mortas nos vasos e em um raio de 2 metros em torno dos vasos. Realizou-se a coleta de cinco amostras de cada repetição por tratamento, que foram acondicionadas e enviadas para análises da *causa mortis* conforme citado acima.

EXPERIMENTO 4: ANÁLISE DA PERSISTÊNCIA DOS FUNGOS NOS TECIDOS DE *U. ruziziensis* E INFECÇÃO EM *M. spectabilis* EM PLANTAS DE DIFERENTES IDADES

Após o tratamento com os fungos (UFMG 11443 e UFMG 11444 e *M. anisopliae* comercial) as sementes de *U. ruziziensis* foram armazenadas por 60 dias em câmara climatizada tipo BOD (22 °C). A partir deste momento, amostras de sementes foram colocadas para germinar a cada 90 dias, por 10 meses consecutivos. As plantas obtidas em cada uma das épocas de semeadura, foram mantidas em vasos com capacidade de 2 L e em casa de vegetação, com adubação, irrigação e podas controladas, de modo a se manter altura aproximada de 25 cm.

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso com as plantas advindas de sementes tratadas com os diferentes fungos ou aquelas não tratadas (controle) com plantas de diferentes idades (1 a 10 meses), com 5 repetições.

Quando as plantas do último lote de sementes apresentavam 45 dias de idade, realizou-se a infestação das plantas, de todos os 10 lotes (épocas de semeadura) com quatro ninfas de terceiro e quarto instares de *M. spectabilis* por vaso, para avaliar a presença e eficiência do fungo no controle do inseto, de modo a definir a persistência do fungo nas sementes armazenadas e nas plantas in vivo, manejadas com a eliminação da parte aérea (cortes), simulando o que acontecerá em uma pastagem.

Para análises da frequência de infecção do fungo no tecido vegetal, uma amostra aleatória foi retirada e alocadas em plásticos estéreis, colocadas em uma caixa térmica e levadas para realização dos testes no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São João Del Rei. Cada folha foi desinfestada na superfície por imersão em etanol a 70% (1 min) e 2% de hipoclorito de sódio (1 min), seguido de lavagem com água destilada estéril (2 min) (Carvalho et al. 2012; Ferreira et al. 2017). Após a desinfecção, um fragmento de cada folha foi alocado em placa de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas a 25° C ± 2° C por

aproximadamente 7 dias em câmara climatizada (BOD). Para verificar a presença do fungo inoculado, a macromorfologia e micromorfologia dos fungos presentes nos fragmentos, foram comparados à dos fungos UFMG 11444 e UFMG 11443 e a do *Metarhizium anisopliae* (comercial). A identificação das espécies dos fungos foi realizada com o auxílio de chaves de identificação de acordo com Alves et al. (1998).

Para análises da frequência de infecção do fungo no inseto-praga alimentado das plantas advindas dos diferentes lotes de sementeira, alocou-se quatro ninfas de *M. spectabilis* por vasos e, para impedir a fuga das ninfas do inseto praga, os vasos foram cobertos com voil. Após dez dias, de alimentação do inseto nos diferentes tratamentos, aquelas ninfas mortas ou vivas foram retiradas, acondicionadas em Eppendorff® de 1,5 mL e congeladas a frizer à -22°C e, em seguida enviadas ao Departamento de Engenharia de Biosistemas (DEPEB), da Universidade Federal de São João del'Rei (UFSJ), Minas Gerais, Brasil para verificar a presença dos fungos nos tecidos dos insetos. A confirmação da presença dos fungos em *M. spectabilis* seguiu a mesma metodologia supracitada para análise nos tecidos das plantas.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Todas as análises de dados foram realizadas com o programa R versão 4.2.2 (R Core Team 2022). Os dados obtidos não atenderam aos pressupostos de normalidade em relação aos resíduos e à homogeneidade da variância (teste de Shapiro-Wilk e teste de Bartlett, $p < 0,01$). Um modelo linear generalizado (GLM) seguido de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para verificar se havia diferenças significativas na proporção de plantas e cigarrinhas expressando a presença de fungos endofíticos e na mortalidade de cigarrinhas que se alimentaram de plantas inoculadas com o fungo endofítico. Para essas comparações foi utilizado o modelo GLM de regressão logística utilizando uma distribuição binomial e o pacote "hnp" (Moral et al. 2017) foi previamente realizado para escolha do melhor modelo. Os

tratamentos foram separados por meio de regressão logística, que permite prever os valores tomados por uma variável categórica, normalmente binária, a partir de uma série de variáveis explicativas contínuas e/ou binárias. Este é um modelo de regressão para variáveis dependentes distribuídas binomialmente. Assim, é um modelo linear generalizado que utiliza logística. Este modelo não tem como premissas a exigência de normalidade dos resíduos ou homogeneidade das variâncias. A variável presença ou ausência de fungos endofíticos nas plantas ou cigarrinha foi incluída no modelo. Os pacotes visreg (Breheny & Burchett 2019), MASS (Ripley, 2019), ggplot2 (Wickham, 2016) e GGally (Schloerke et al., 2021) foram utilizados para a regressão logística.

Resultados

FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO E PERSISTÊNCIA DOS FUNGOS NOS TECIDOS VEGETAIS

Os fungos entomopatogênicos UFMG 11443, UFMG 11444 e *M. anisopliae* (comercial) foram isolados nos tecidos de *U. ruzizensis*, 45 dias após o tratamento das sementes, o que confirma sua capacidade endofítica. A porcentagem de plantas detectadas com os fungos nos tecidos vegetais esteve acima de 60% e não foram significativamente diferentes quando as sementes foram tratadas pelos diferentes fungos, as quais foram significativamente ($P < 0,0001$) superiores daquelas advindas de sementes não tratadas (Figura 1A). Além disso, foi constatado que o período de permanência dos fungos nas plantas foi significativamente reduzido em plantas com 150 dias após a semeadura, quando comparadas com aquelas de 45 dias de semeadura ($P = 0,0011$) (Figura 1B).

ISOLAMENTO DOS FUNGOS NAS CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS E MORTALIDADE DO INSETO-PRAGA EM CASA DE VEGETAÇÃO

Os fungos entomopatogênicos, UFMG 11443, UFMG 11444 e *M. anisopliae* (comercial) foram isolados de *M. spectabilis* e *D. schach* alimentadas de plantas advindas de sementes tratadas com os respectivos fungos. A porcentagem da presença dos fungos não diferiu significativamente ($P=0,183$) entre espécie *M. spectabilis* e *D. schach* (Figura 2A) nem entre as suas fases de desenvolvimento ($P = 0,742$) de *M. spectabilis* e *D. schach* (Figura 2B), demonstrando assim que as amostras de fungos entomopatogênicos utilizados atinge tanto ninfas quanto adultos dessas espécies de cigarrinhas das pastagens. No entanto, apesar da confirmação da presença dos fungos nas cigarrinhas, estes promoveram mortalidades ninfal abaixo de 20% e, não diferiram significativamente ($P = 0,985$) daquelas alimentadas de plantas advindas de sementes não tratadas pelos fungos (controle) (Figura 2C).

Quando ofertou-se plantas advindas dos mesmos tratamentos para os adultos sobreviventes constatou-se que os indivíduos adultos mortos confirmaram a infecção com os respectivos fungos endofítico, não diferindo estatisticamente entre si, mas diferiram do controle ($P = 0,0010$) (Figura 2 D).

ISOLAMENTO DOS FUNGOS NAS CIGARRINHAS-DAS-PASTAGENS E MORTALIDADE DO INSETO-PRAGA EM CONDIÇÕES DE CAMPO

A introdução de vasos com plantas advindas de sementes tratadas com os fungos UFMG 11443, UFMG 11444, *M. anisopliae* foram capazes de ocasionar infecção de adultos de *M. spectabilis* criadas nas touceiras de capim elefante mantidas em campo. Isso foi confirmado na *causa mortis* dos adultos coletados nas proximidades e/ou nas plantas inseridas no campo, que foi acima de 75% para os três fungos, os quais obtiveram diferença significativa ($P < 0,0001$)

apenas do tratamento controle, no qual as cigarrinhas mortas não estavam infectadas pelos fungos entomopatogênicos (Figura 3).

ANÁLISE DA PERSISTÊNCIA DOS FUNGOS NOS TECIDOS DE *U. ruzizensis* E INFECÇÃO EM *M. spectabilis*, EM PLANTAS DE DIFERENTES IDADES

Não houve interação significativa ($P=0,93$) das espécies de fungos entomopatogênicos e do período de armazenamento das sementes tratadas/idades das plantas. Sendo assim, os fatores foram analisados separadamente.

A frequência de infecção por fungos entomopatogênicos e endofíticos variou de 5 a 40% em plantas advindas de sementes armazenadas por 90 dias após a inoculação dos fungos (plantas com 330 dias) ou armazenadas por 360 dias após inoculação (plantas com 60 dias), respectivamente; porém, não foi significativamente diferente ($P=0,169$) entre a plantas provenientes de diferentes dias após a inoculação. Isto evidencia a persistência desses fungos nas plantas e nas sementes armazenadas (Tabela 1).

Insetos alimentados em plantas advindas de sementes armazenadas por 90 dias (plantas com 330 dias) ou armazenadas por 360 dias (plantas com 60 dias), apresentaram a frequência de infecção por fungos entomopatogênicos de 21,8 a 58,3%; porém, não apresentou diferenças significativas ($P= 0,464$) entre o tempo após a inoculação dos fungos, o que reforça a persistência dos fungos nas sementes armazenadas por até 300 dias e em plantas com 300 dias após a semeadura (Tabela 1).

A frequência da infecção por fungos nos tecidos das plantas e nas ninfas de *M. spectabilis* foi significativamente nos tratamentos com o controle e não difeririam entre si, com média de 28,6 e 53,8% nos tecidos das plantas ($P<0.0001$) e do inseto-praga ($P<0.0001$), respectivamente (Tabela 1).

Discussão

O uso de fungos entomopatogênicos para controle biológico de cigarrinhas-das-pastagens pode beneficiar a cadeia produtiva, pois diminuiria o uso de produtos fitossanitários que são prejudiciais tanto para os animais, o homem e o meio ambiente; além de serem, na maioria das vezes, antieconômicos e antiecológicos.

As porcentagens de eficiência no controle da cigarrinha-das-pastagens por meio da aplicação de *M. anisopliae* situam-se entre 10% e 60%. A qualidade do fungo aplicado por unidade de área, o método de aplicação, o isolado empregado e as condições climáticas durante as aplicações são fatores que promovem essa grande variação na eficiência (Giraldo et al. 2011). No entanto, essa estratégia é eficiente, quando empregada no momento certo e com produtos de fontes idôneas (Aquad; Silva, 2019).

Pereira et al. (2018), registraram a influência do clima seco, o horário de aplicação do fungo, pois os raios solares são prejudiciais aos fungos entomopatogênicos; além do método de aplicação na eficiência do *M. anisopliae* (isolado IBCB 425) no controle de *Deois flavopicta* em pastagem de braquiária. Greenfield et al. (2016) também reitera que a eficácia de fungos entomopatogênicos é limitada também por outros fatores abióticos (por exemplo, radiação UV, temperatura, baixa umidade) que reduzem a viabilidade de conídios fúngicos. Assim, esses autores apontam como alternativa a inoculação das plantas com fungos entomopatogênicos que se estabelecem como endófitos, proporcionando proteção do fungo contra fatores abióticos.

Ao longo da evolução, os fungos desenvolveram diversos mecanismos para interagirem com uma variedade de organismos vivos, incluindo plantas. Distintos gêneros de fungos entomopatogênicos também foram identificados como endofítico. Portanto, o estilo de vida multifacetado dos fungos entomopatogênicos, como saprófitos, endofítico e agentes de biocontrole, pode oferecer diversos benefícios à planta hospedeira, como promover o crescimento e proteção contra patógenos e insetos-praga. (González-Pérez et al. 2022).

O uso de fungos para controle biológico de pragas está em desenvolvimento, e com isso pode haver aumento na produção de micoinseticida para evitar o uso de elementos químicos nocivos à natureza nos processos agrícolas (Barão et al. 2022). Parra (2014), relata que, no Brasil, *M. fimbriolata* é controlada com o fungo *M. anisopliae*, cobrindo uma área de 2 milhões de ha. Mantzoukas e Lagogiannis (2019) apontam que espécies entomopatogênicas como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium spp.* e *Isaria fumosorosea* têm sido relatadas com alto potencial patogênico em insetos, quando inoculados em plantas. Esses conseguiram entrar nos tecidos da planta após pulverização dos conídios com infecção diminuída significativamente a partir de 14 dias, contrapondo esses resultados, os fungos *M. anisopliae* UFMG 11443 e UFMG 11444, utilizados na presente pesquisa, tiveram a taxa de infecção diminuída em plantas de 120 e 150 dias de inoculação dos conídios via semente. Além disso, ressalta-se que a porcentagem de infecção esteve acima de 60%, o que comprovou a endofítia de todos os fungos utilizados na presente pesquisa.

O sucesso de um micoinseticida depende de vários critérios, sendo que o principal é seu nível de virulência (Campagnani et al. 2017). Em estudo com cana de açúcar, a aplicação de *M. anisopliae*, via pulverização, com vistas ao controle da cigarrinha das raízes, *M. fimbriolata*, resultou na mortalidade de 50% das ninfas após sete dias, com eficiência menor em insetos adultos. Esta mortalidade pode ser considerada alta, em se tratando de aplicação realizada com predomínio de sol e temperaturas elevadas (Iwanicki, 2015).

Pitta et al. (2019) utilizando *M. anisopliae* para combater infestação de *M. spectabilis* obtiveram resultado satisfatório tanto para a infecção de ninfas e adultos, o que é corroborado na presente pesquisa, na qual a infecção por *M. anisopliae*, UFMG 11443 e UFMG 11444 foi igual para o estágio ninfal e adultos de *M. spectabilis* e *D. schach* em casa de vegetação. Esses fungos foram coletados pela primeira vez no Maranhão, sendo registrados como eficientes (Campagnani et al. 2017) e endofíticos (Campagnani (2020) - dados não publicados).

No presente estudo, a frequência de infecção dos insetos-pragas foi acima de 50% (em casa de vegetação) e acima de 60% (no campo). No entanto, apesar da confirmação da presença dos fungos nas cigarrinhas, esses promoveram mortalidades abaixo de 20% e não diferiram significativamente daquelas alimentadas de plantas advindas de sementes não tratadas pelos fungos, no bioensaio de casa de vegetação. Esses resultados diferem dos obtidos por (Campagnani (2020) - dados não publicados), que sugeriram que os mesmos isolados fúngicos tiveram potencial para uso como biopesticidas, pois proporcionaram mortalidade ninfal de *M. spectabilis* acima de 88%. Tal diferença pode ser atribuída pelo fato que no presente trabalho as ninfas utilizadas nos experimentos foram obtidas no mesmo ambiente de estudo, enquanto aquelas utilizadas por (Campagnani (2020) - dados não publicados) as ninfas utilizadas nos experimentos foram advindas do campo experimental, o que possivelmente proporcionaram uma população de ninfas com determinado grau de estresse, com por exemplo, diferença de temperatura, manuseio na coleta e transporte até o laboratório. Esse estresse pode ter facilitado a infecção pelos fungos entomopatogênicos. Outro fator que pode explicar a tão grande diferença entre resultados diz respeito a virulência dos fungos utilizados, pois aqueles utilizados na presente pesquisa estavam armazenados em geladeira (-2 °C) e contavam com a terceira repicagem e os utilizados por Campagnani foram advindos de primeira repicagem após a infecção do hospedeiro, sendo necessário desenvolver novas linhas de pesquisas para estabelecer condições de armazenamento e repicagem de fungos.

Acredita-se que uma outra forma de amenizar a dependência dos fatores climáticos dos fungos entomopatogênicos, aos fatores abióticos, no controle das cigarrinhas das pastagens é a forma que esse é introduzido na lavoura, sendo o uso de plantas banqueiras uma opção. As plantas banqueiras atuam de modo direto ou indireto, fornecendo recursos como, presas ou hospedeiros e alimentos para inimigos naturais que são deliberadamente adicionados num sistema de cultivo, auxiliando na reprodução e manutenção das comunidades desses inimigos naturais próximos da cultura, fornecendo o controle da praga específica (Zheng et al. 2017), o

que foi corroborado no presente estudo que inseriu vasos de plantas obtidas por tratamento de semente contendo os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* (comercial), UFMG 11443 e UFMG 11444 no meio de uma plantação infestadas com cigarrinhas das pastagens, para combater infestação de *M. spectabilis*, conseguindo obter resultados positivos na infecção de 75% dos adultos coletados no entorno ou dentro dos vasos inseridos no campo.

Em um programa de melhoramento de forrageiras, o armazenamento das sementes consiste em manutenção de características genéticas, morfológicas e fisiológicas para sustentar a seleção de matérias com características desejáveis ao longo de tempo. Além disso, a manutenção da viabilidade e da presença de fungos endofítico nas sementes são estratégias a serem pesquisadas no processo de armazenamento de sementes. Baseado nisso, Cheplick (2017) constatou-se que fungos endofítico (*Epichloe festucae* var. *lolii*) persistem de 58 a 73% em planta se *Lolium perene*, provenientes de sementes armazenadas por 22 anos. No presente estudo, os fungos entomopatogênicos utilizados nos tratamentos de sementes (UFMG 11443, UFMG 11444 e *M. anisopliae*) tiveram a frequência de infecção entre 5 a 40% nos tecidos de *U. ruzizensis* e 21,8 a 58,3 em ninfa de *M. spectabilis*, após 12 meses da inoculação dos fungos nas sementes. O que comprova que apesar de alterações da frequência de infecção ao longo do tempo os fungos são capazes de persistir.

Vale ressaltar que essa persistência está atrelada a cultivares utilizadas e/ou fatores abióticos envolvidos no armazenamento. Latch e Christensen (1982) constatou-se que em plantas de azeven perene os endófitos viáveis são encontrados em 40% das sementes do cultivar Nui armazenadas a -5 °C por 7 anos, e em 80% das plantas de sementes da cv. Ellett armazenadas por 6 anos. Clement et al (2008) também verificaram variação na infecção por *Neotyphodium* pós armazenamento, em função de 20 acessos de *Lolium arundinaceum*. Além, disso a viabilidade de fungos endofíticos pode ser reduzida em função de fatores abióticos. Isso foi afirmado na pesquisa de Welty et al. (1987) que registraram que sementes de *Festuca arundinacea* armazenadas por 18 meses, registraram interação da temperatura, teor de umidade

e tempo de armazenamento na viabilidade de fungos endofíticos (*Acremonium coenophialum*), com redução significativa quando em altas temperaturas.

Os fatores bióticos e abióticos supracitados devem ser inseridos em novas pesquisas que envolvem o armazenamento de *U. ruzizensis* inoculadas com fungos entomopatogênicos. Os resultados da presente pesquisa na qual as sementes tratadas foram armazenadas à 22 °C, por 12 meses, forneceram cenário otimista para o armazenamento de sementes infectadas por fungos entomopatogênicos em *U. ruzizensis*, que terá ação em mais de um ciclo do inseto praga, que usualmente ocorre em período bem definido, outubro a março de cada ano; o que reforça que as sementes tratadas podem ser armazenadas por um ano, e aquelas plantas do ano anterior irão gerar pastagens que, também, tenha algum efeito negativo para o inseto-praga, considerando que plantas manejadas com a eliminação da parte aérea (cortes), simulando o que acontecerá em uma pastagem, após 10 meses apresentaram fungos entomopatogênicos.

Dessa forma ficou evidente que os fungos entomopatogênicos foram endofíticos, infectam igualmente as espécies de cigarrinhas das pastagens *M. spectabilis* e *D. schach* nos diferentes estágios de desenvolvimento; porém, ocasionaram baixa mortalidade ninfal. O uso da técnica de planta banqueira contendo plantas advindas de sementes tratadas com os fungos entomopatogênicos foi eficiente. Ademais, observou-se que é possível armazenar as sementes tratadas com os fungos por 12 meses, e detectar durante esse período a infecção de fungos endofíticos em pastagens formadas no ano anterior, e sendo necessário novos estudos para verificar a porcentagem de infecção por mais de 12 meses.

Referências Bibliográficas

- Alvarenga R, Auad AM, Moraes JC, Silva SE. 2019. Do silicon and nitric oxide induce resistance to *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in forage grasses? *Pest Management Science* 75: 3282–3292.
- Alves SB. 1998. Fungos entomopatogênicos, pp. 289–381 In Alves SB. Controle Microbiano de Insetos. Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Brazil.
- Andorno AV, López SN. 2014. Biological control of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) through banker plant system in protected crops. *Biological Control* 78: 1–9.
- Auad AM, Silva SEB. 2019. Pasture, pp. p. 369-382 In Souza B. *et al.* Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems: Biological Control and Functional Biodiversity. Springer, Cham, Switzerland.
- Auad AM, Simões AD, Pereira AV, Braga ALF, Souza Sobrinho F, Léo FJDS, Paula-Moraes SV, Oliveira AS, Ferreira RB. 2007. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 1077-1081.
- Barão NC, Carla R, Everlon C. 2022. Fungos endofíticos: uma ferramenta para promoção do crescimento de plantas e agricultura sustentável. *Micologia* 13: 39-55.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2022. Mapa do leite: políticas públicas e privadas para o leite. Brasília, Brasil, <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite> (last accessed 30 Oct 2022).
- Breheeny P, Burchett W. 2019. Package “visreg”. Available from <https://cran.r-project.org/web/packages/visreg/visreg.pdf> [accessed 08 January 2023].
- Campagnani MO. 2017. Prospection and Fungal Virulence Associated with *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in an Amazon Silvopastoral System. *Florida Entomologist* 100: 425-432.

- Carvalho CR, Gonçalves VN, Pereira CB, Johann S, Galliza IV, Alves TMA, Rabello A, Sobral, M EG, Zani CL, Rosa CA, Rosa LH. 2012. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis* 57:95-107.
- Cheplick, GP. 2017. Persistence of endophytic fungi in cultivars of *Lolium perenne* grown from seeds stored for 22 years. *American Journal of Botany* 104: 627-631.
- Clement SL, Martin RC, Dombrowski JE, Elberson LR, Kynaston M, Azevedo MD. 2008. Neotyphodium endophytes in tall fescue seed: viability after seed production and prolonged cold storage. *Seed Science and Technology*, 36: 710-720.
- Congio GFS, Almeida PC, Barreto TR, Tinazo VA, Silva TACC, Costa DFA, Corsi M. 2012. Regrowth of Marandu palisade grass submitted to spittlebugs attack. *Arquivos do Instituto Biológico* 79:389–396.
- Congio GFS, Almeida, PC, Barreto TR. 2020. Spittlebug damage on tropical grass and its impact in pasture-based beef production systems. *Sci Report* 10: 10758.
- Dias Filho MB. 2017. Soluções para problemas recorrentes em pastagens no Pará. EMBRAPA Amazônia Oriental, Brasília, Brazil.
- Dias ML, Auad AM, Magno MC, Resende TT, Fonseca MG, Silva SE. 2019. Insecticidal Activity of Compounds of Plant Origin on *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). *Insects* 10:1-11.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2021. Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo. Brasília, <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo> (last accessed 20 Jun. 2022).

- Fazolin M, Santos RS, Andrade CMS, Assis GML, Valentim JF. 2016. Cigarrinhas-das-pastagens: como identificar e controlar a principal praga das Pastagens. Embrapa Acre, Rio Branco, AC, Brazil. 1 Folder.
- Ferreira MC, Cantrell CL, Wedge DE, Gonçalves VN, Jacob MR, Khan S, Rosa CA, Rosa LH. 2017. Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. *Biochemical Systematics and Ecology* 71: 163-169.
- González-Pérez E, Ortega-Amaro MA, Bautista E, Delgado-Sánchez P, Jiménez-Bremont JF. 2022. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances *Arabidopsis*, tomato, and maize plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 176: 34–43.
- Greenfield M, Gómez-Jimenez MI, Ortiz V, Veja FE, Kramer M, Parsa S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control* 95:40-48.
- Huang N, Enkegaard A, Osborne LS, Ramakers PM, Messelink GJ, Pijnakker J, Murphy G. 2011. The Banker Plant Method in Biological Control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30: 259–278.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2020. Atlas do Espaço Rural Brasileiro / IBGE 2020. Rio de Janeiro, <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2101773> (last accessed 23 jul. 2021).
- Iwanicki NS. 2015. Monitoramento de *Metarhizium* spp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) por marcadores moleculares em plantios de cana-de-açúcar. Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Latch GCM, Christensen MJ. 1982. Ryegrass endophyte, incidence, and control. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 25: 443 – 448.
- Mantzoukas S, Lagogiannis I. 2019. A colonização endofítica de pimenta (*Capsicum annum*) controla pulgões (*Myzus persicae* Sulzer). *Ciências Aplicadas* 9: 2239.

- Nascimento VF, Auad AM, Resende TT. 2021. Olfactory Response of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) to Volatile Aqueous Extracts of Plant Origin Applied to Elephant Grass Plants (*Pennisetum purpureum* Schum). *Agronomy* 11: 1-9.
- Paladini A, Takiya DM, Urban JM, Cryan JR. 2018. New world spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae: Ischnorhininae): dated molecular phylogeny, classification, and evolution of aposematic coloration. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 120:321-334.
- Parra JRP. 2014. Biological Control in Brazil: An overview. *Scientia Agricola* 71: 345-355.
- Pereira JF, Machado JC. 2018. Research priorities for next-generation breeding of tropical forages in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18: 314-319.
- Pitta RM, Matiero SC, Corassa JN, Rampelotti-Ferreira FT. 2019. Influência de sistemas pastoris sobre *Mahanarva spectabilis* (Distant) (Hemiptera: Cercopidae) e o entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Scientific Electronic Archives* 12: 13–20.
- Pucheta DMF, Rodríguez NS, De la Torre M. 200). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 12:31 856-860.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Resende TT, **Auad AM**, Fonseca MG, Souza Sobrinho F, Santos DR, Silva SEB. 2013. The damage capacity of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) adults on *Brachiaria ruziziensis* pasture. *The Scientific World Journal* 1-7.
- Ribeiro LP, Cazarotto AR. 2019. Cigarrinhas-das-pastagens em Santa Catarina: avaliação do complexo de espécies e da incidência natural de fungos entomopatogênicos. *Agropecuária Catarinense* 32: 73-79.
- Ripley B. 2019. Package “MASS.” Title: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS. R package version: 7.3-51.4 <https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/MASS.pdf>.

- Schloerke B, Cook D, Larmarange J, Briatte F, Marbach M, Thoen E, Elberg A, Crowley J. 2021 GGally: Extension to 'ggplot2'. R package version 2.1.2. <https://CRAN.R-project.org/package=GGally>
- Silva I, Noboa CS, Vale JPI, Matta F, Vigna BBZ, Favero AP, Gusmao MR. 2017. Antibiose em genótipos de *Paspalum* spp. à cigarrinha *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). Anais da nona Jornada Científica – EMBRAPA, 2017. São Carlos, SP, EMBRAPA Pecuária Sudeste.
- Silva JDC. 2019. Manejo ecológico da cigarrinha das raízes *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (HEMIPTERA: CERCOPIIDAE) em cana-de-açúcar. 2019. Tese. Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brazil.
- Valério JR. 2009. Cigarrinhas- das- pastagens: Vol 1. Embrapa Gado de corte, Campo Grande, MS, Brazil.
- Valle B, Jank L, Resende RMS. 2009. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Ceres* 56: 460-472.
- Valverde AHP. 2006. Resistência em genótipos de *Brachiaria* a ninfas de três espécies de cigarrinha-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae). Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.
- Welty RE, Azevedo MD, Cooper TM. 1987. Influence of moisture content, temperature, and length of storage on seed germination and survival of endophytic fungi in seeds of tall fescue and perennial ryegrass. *Phytopathology*, 77: 893-900.
- Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York. doi:10.1007/978-0-387-98141-3.
- Zheng X, Lu Y, Zhu P, Zhang F, Tian J, Xu H, Chen G, Nansen C, Lu Z. 2017. Use of banker plant system for sustainable management of the most important insect pest in rice fields in China. *Scientific Reports* 7: 1-8.

Tabela 1. Frequência de infecção de fungos endofítico nos tecidos das plantas de *U. ruzizensis* ou em ninfas de *M. spectabilis* quando alimentadas de plantas advindas de sementes estocada por 12 meses, após o tratamento das sementes com fungos endofíticos.

Período de armazenamento das sementes tratadas (dias)	Idade da Planta utilizada no experimento (dias)	Frequência de Infecção (%)	
		Na planta	No inseto
90	330	5,0	21,8
120	300	15,0	45,9
150	270	15,0	33,3
180	240	15,0	57,1
210	210	25,0	28,5
240	180	20,0	36,3
270	150	30,0	54,1
300	120	20,0	36,3
330	90	30,0	58,3
360	60	40,0	36,6
Significância		$P=0,46$ (ns)	$P=0,1692$ (ns)
Controle		0	0
<i>M. anisopliae</i>		30	54,5
UFMG 11443		26	55,3
UFMG11444		30	51,7
Significância		$P<0,0001$	$P<0,0001$

(ns) = não significativo. Valores de frequência da infecção de fungos endofíticos em tecidos das plantas ou nos insetos, seguidos pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pela análise de variância.

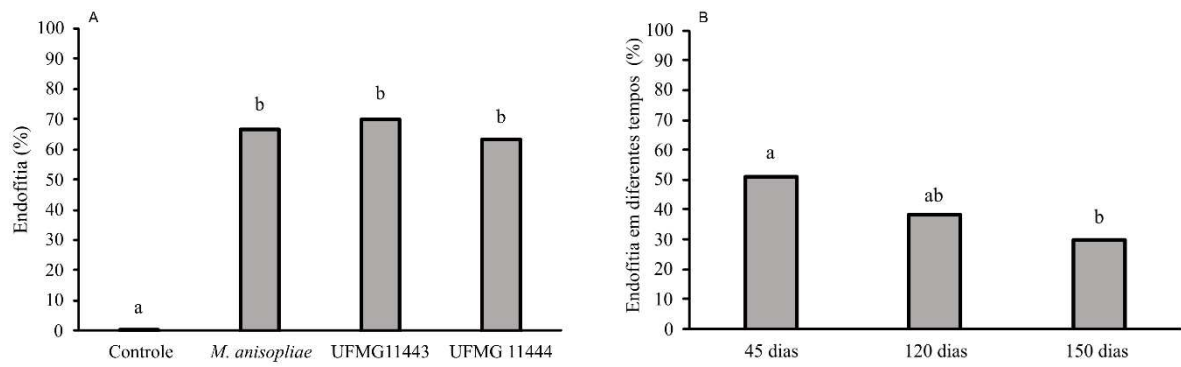


Figura 1- Fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, UFMG 11443, UFMG 11444 presentes nas folhas de *Urochloa ruziziensis* com 45 dias de idade (A). Presença dos fungos entomopatogênicos nas plantas advindas de sementes tratadas ao longo do tempo (B).

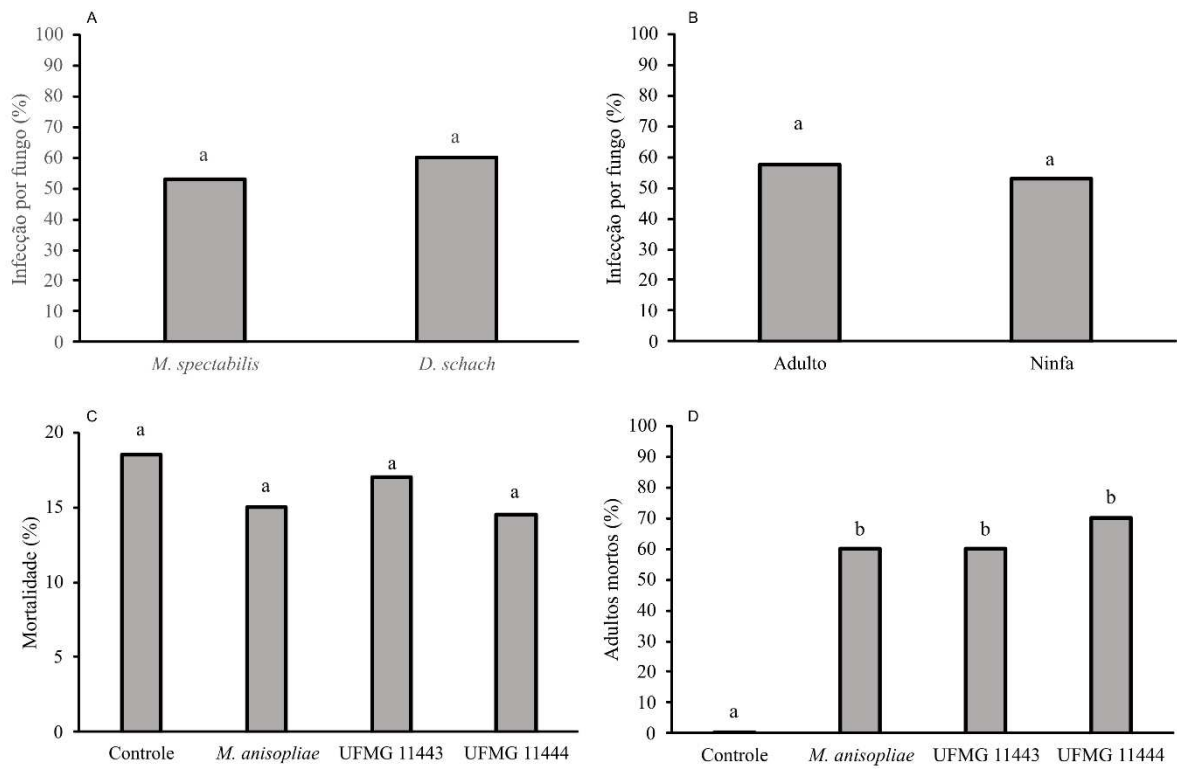


Figura 2- Indivíduos de *M. spectabilis* e *D. schach* alimentados com plantas infectadas com os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, UFMG 11443, UFMG 11444 (A). Adultos e ninfas com presença dos fungos entomopatogênicos (B). Mortalidade das cigarrinhas-das-pastagens (C). Adultos mortos infectados após se alimentarem da planta contendo os fungos entomopatogênico (D).

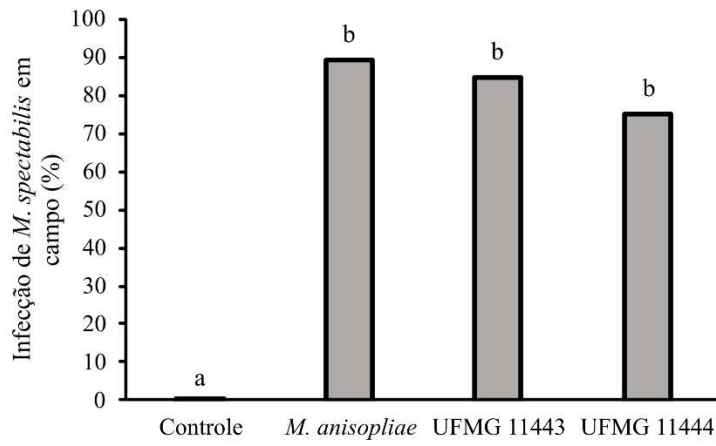


Figura 3- Adultos mortos de *M. spectabilis* coletados em campo infectados com os fungos entomopatogênicos.