

CONTROLE BIOLÓGICO

Avaliação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para Controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)MICHELE POTRICH¹, LUIS F. A. ALVES^{2,3}, NATALIA R. MERTZ² E EVERTON R. L. DA SILVA¹

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/CCA, Campus Marechal Cândido Rondon. Programa de Pós-graduação em Agronomia, Curso de Mestrado. E-mail: profmichele@gmail.com, evertonloz@gmail.com.

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/CCBS, Campus Cascavel. Rua Universitária, 2096, Jardim Universitário, 85814-110, Cascavel, PR. E-mail: lfaalves@unioeste.br, nataliamertz@bol.com.br.

³ Bolsista Produtividade em Pesquisa, CNPQ

BioAssay 1:12 (2006)

Evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

ABSTRACT – This research aimed to evaluate, under laboratory conditions, the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok to control *Sitophilus zeamais* Mots. Bioassays were conducted to evaluate the pathogenicity of 16 isolates of *B. bassiana* and 2 isolates of *M. anisopliae*, based on virulence, vegetative growth and conidia production in Petri dishes and on rice and insect cadavers. All tested isolates were pathogenic to *S. zeamais*. The highest cumulative mortalities at 5th day were obtained with the isolates Unioeste 4, Unioeste 39 e Esalq 643 of *B. bassiana*. Regarding to the virulence, these three isolates did not differ among themselves. However, regarding to the colony average diameter, conidia production per colony and per cadaver, the isolate Esalq 643 was the most effective one. Regarding to rice conidia production, both Unioeste 4 and Esalq 643 isolates were equally productive. In general, the isolates Esalq 643 and Unioeste 4 were very effective with potential for exploiting in the microbial control of *S. zeamais*.

KEYWORDS – microbial control, maize weevil, stored grain pests, entomopathogenic fungi

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo avaliar, em condições de laboratório, os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. Foram realizados bioensaios de patogenicidade e comparação de 16 isolados de *B. bassiana* e 2 isolados de *M. anisopliae*, avaliando-se a patogenicidade, virulência, crescimento vegetativo e produção de conídios em placa-de-Petri e em arroz e cadáver dos insetos. Todos os isolados foram patogênicos a *S. zeamais*. As mortalidades acumuladas mais elevadas ao 5º dia foram obtidas com os isolados Unioeste 4, Unioeste 39 e Esalq 643 de *B. bassiana*. Quanto à virulência, esses três isolados não diferiram entre si, no entanto, em relação ao diâmetro médio de colônia, produção de conídios por colônia e produção de conídios por cadáver, o isolado Esalq 643 foi o mais eficiente. Na produção média de conídios em arroz, os isolados Unioeste 4 e Esalq 643 não diferiram entre si, sendo ambos produtivos. Em geral, os isolados Esalq 643 e Unioeste 4 se mostraram eficientes, tendo potencial para explorar no controle microbiano de *S. zeamais*.

PALAVRAS-CHAVE – controle microbiano, gorgulho, praga de grãos armazenados, fungo entomopatogênico

Sitophilus zeamais Mots. (Coleoptera: Curculionidae) é considerado uma das principais pragas do milho armazenado, responsáveis pelos maiores danos e prejuízos na sua qualidade, tornando-o impróprio para industrialização e para o consumo humano (Caneppele *et al.* 2003). O expurgo dos grãos com fosfina (fosfeto de alumínio ou fosfeto de magnésio) é controle mais utilizado para esses insetos.

No entanto, estes produtos têm persistência nos alimentos e no meio ambiente, além de serem tóxicos aos aplicadores e selecionarem populações de insetos resistentes (Andrade Jr. *et al.* 2003).

Uma alternativa mais sustentável no controle de *Sitophilus* spp. seria a utilização de entomopatógenos, que poderiam ser empregados juntamente com inseticidas seletivos e outros métodos de controle.

Esses microrganismos, em geral, não selecionam populações resistentes, não causam poluição ao ambiente e não são tóxicos para o ser humano e outros animais (Alves 1998a). No entanto, a ação dos entomopatogênicos é mais lenta e a maioria necessita de condições adequadas para manter sua viabilidade e patogenicidade (Alves 1998a, Lord 2005).

Os fungos são os entomopatogênicos que apresentam maior potencial de uso no controle de *Sitophilus* spp., pois seu modo de ação é baseado, principalmente, no contato do inseto com os conídios (Alves & Lecuona 1998). Além disso, os conídios e os esporos têm alta capacidade de dispersão horizontal, sendo transportados por vários agentes a grandes distâncias, compondo focos de disseminação (Alves 1998b, Castrillo *et al.* 2005).

Dada a grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos, Alves (1998b) e Dal Bello *et al.* (2001) destacam a importância da realização de bioensaios para a seleção de isolados altamente virulentos, persistentes e com boa capacidade de reprodução. Desta forma, aumenta-se o potencial dos fungos entomopatogênicos como inseticidas microbiológicos. Especialmente para *S. zeamais* e *S. oryzae*, Moino Jr. *et al.* (1998) e Dal Bello *et al.* (2001) também observaram a variabilidade de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* quanto à infectividade.

Os fungos entomopatogênicos com maior potencial para o controle de insetos-praga de grãos armazenados são *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., sendo considerados seguros para seus aplicadores ou mesmo para os demais organismos vivos (Pereira *et al.* 1998).

Os poucos trabalhos que abordam o controle de *Sitophilus* spp. com fungos entomopatogênicos seguiram metodologias diferentes da utilizada nessa pesquisa. Moino Jr. *et al.* (1998) obtiveram em seus trabalhos mortalidade confirmada de *S. oryzae* e *S. zeamais* com *B. bassiana* próxima a 100%. Também foi verificado o controle de *S. zeamais* por *B. bassiana* em grãos tratados previamente, com redução do número de adultos emergidos (Moino Jr. & Alves 1998). Estudos realizados com *S. oryzae* em trigo, tratado e não-tratado com *B. bassiana*, mostraram que os grãos sem o tratamento sofreram um dano significativamente maior do que os grãos tratados (perda de peso de 38,3% contra 7,1%, respectivamente) (Padín *et al.* 2002).

A eficiência dos entomopatogênicos e as grandes áreas tratadas têm aumentado sua credibilidade, porém ainda é colocada em dúvida por muitos produtores (Lacey *et al.* 2001, Parra *et al.* 2002). Por outro lado, os métodos de seleção, produção, formulação, o melhor entendimento de como ele se mantém em sistemas integrados e suas interações com o desenvolvimento de outros componentes do MIP, devem fazer com que todas as suas vantagens (eficácia, seletividade e segurança) sejam evidenciadas, e não simplesmente comparar com os agrotóxicos. Além

disso, a demanda mundial por alimentos mais saudáveis, exige que a qualidade do grão colhido na lavoura seja mantida, com o mínimo possível de perdas, além da redução na utilização dos produtos químicos, ressaltando a importância do controle microbiano.

Assim, frente aos poucos trabalhos sobre a ação de fungos contra *S. zeamais* e visando contribuir com futuros programas de controle biológico deste inseto, objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência e produtividade de novos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, com base na análise da virulência, diâmetro médio de colônias em placa de Petri, produção de conídios por colônia, produção média de conídios por cm², produção de conídios em arroz e em cadáver de inseto para os isolados selecionados.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Zoologia de Invertebrados da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* de Cascavel. Adultos de *S. zeamais* utilizados no bioensaio foram provenientes da criação do próprio laboratório, com idade entre 30 e 60 dias, não sexados e alimentados com grãos de arroz polido.

Os isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram provenientes do banco de entomopatogênicos do próprio Laboratório de Zoologia de Invertebrados da Unioeste – *Campus* Cascavel (Tabela 1), e foram reativados em larvas de cascudinho-de-aviário, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), previamente à realização dos experimentos. O procedimento foi realizado pela inoculação de insetos sadios em suspensões dos isolados, e após a conidiogênese sobre o inseto, cada isolado foi cultivado em M.E. (meio de esporulação) (Alves *et al.* 1998) e os conídios recolhidos e armazenados a -10°C.

Além destes, foi utilizado o isolado Esalq 643 (*B. bassiana*), proveniente do Laboratório de Patologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq/USP), selecionado para controle de *S. zeamais* por Moino Jr. *et al.* (1998) e testado posteriormente por Moino Jr. & Alves (1998), servindo como isolado padrão.

A partir do inóculo ativado, os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo M.E., incubados por 8 dias a 26±1°C e 14h de fotofase. Em seguida, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio e armazenados em frascos de vidro esterilizados, mantidos a -10°C até a utilização nos bioensaios, por um tempo que não ultrapassou 15 dias.

As suspensões de conídios foram preparadas com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80 (0,01%) (Synth, São Paulo), e quantificadas em câmara de Neubauer e padronizadas na concentração de 1,0×10⁹ conídios/mL, aproximando-se da concentração utilizada nos experimentos de Moino Jr. *et al.* (1998).

Tabela 1. Isolados de fungos entomopatogênicos utilizados no bioensaio e respectiva origem.

| Isolados | Hospedeiro original ou substrato | Local de origem |
|--------------------------|---|-----------------------------|
| Unioeste 1 ¹ | <i>Astylus variegatus</i> (Germar) | Cascavel, PR |
| Unioeste 3 ¹ | <i>Alphitobius diaperinus</i> (Panzer) | Cascavel, PR |
| Unioeste 4 ¹ | <i>A. diaperinus</i> | Cascavel, PR |
| Unioeste 5 ¹ | <i>A. diaperinus</i> | Cascavel, PR |
| Unioeste 22 ² | Solo, plantação de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) | Cascavel, PR |
| Unioeste 25 ¹ | Solo, plantação de erva-mate | Cascavel, PR |
| Unioeste 26 ¹ | Solo, plantação de erva-mate | Cascavel, PR |
| Unioeste 36 ¹ | Coleoptera: Chrysomelidae | Cascavel, PR |
| Unioeste 37 ¹ | <i>Bombyx mori</i> (L.) | Arapongas, PR |
| Unioeste 38 ¹ | <i>B. mori</i> | Ibaiti, PR |
| Unioeste 39 ¹ | <i>Cosmopolites sordidus</i> (Germar) | São Miguel do Iguaçu, PR |
| Unioeste 40 ¹ | Coleoptera: Curculionidae | Cascavel, PR |
| Unioeste 41 ¹ | <i>A. variegatus</i> | Cascavel, PR |
| Unioeste 42 ¹ | Coleoptera: Erotylidae | Cascavel, PR |
| Unioeste 43 ² | Hymenoptera: Formicidae | São Miguel do Iguaçu, PR |
| Unioeste 44 ¹ | Hemiptera: Pentatomidae | Toledo, PR |
| Unioeste 45 ¹ | <i>A. variegatus</i> | Marechal Cândido Rondon, PR |
| Esalq 643 ¹ | Solo | Lavras, MG |

¹*Beauveria bassiana*, ²*Metarhizium anisopliae*

Avaliação da patogenicidade. Adultos de *S. zeamais* foram imersos em 1mL de suspensão de conídios sob agitação manual, durante 10 segundos. Posteriormente, foram retirados e acondicionados em placas de Petri contendo papel filtro e arroz polido. Para cada isolado foram preparadas quatro repetições, cada uma com quinze insetos. As placas foram mantidas em potes plásticos com espuma umedecida ao fundo, e incubados a 26±1°C e fotofase de 14h, gerando condições adequadas para o fungo se desenvolver, independente do local a ser utilizado.

O experimento foi avaliado diariamente por um período de 10 dias, sendo os insetos mortos imersos em solução de álcool 70% e água destilada esterilizada para a desinfestação superficial. Em seguida, foram acondicionados, individualmente, em placas de polietileno contendo papel filtro esterilizado umedecido (câmara úmida) e estas foram colocadas no interior de um recipiente plástico com espuma umedecida ao fundo, nas mesmas condições citadas anteriormente por 7 dias, para confirmação da mortalidade pelo patógeno.

Pelo fato de cada um dos isolados ter sido avaliado separadamente, nas diferentes concentrações, os dados foram analisados apenas graficamente e os isolados que provocaram mortalidade confirmada mínima de 80% foram selecionados. Destes, os três que apresentaram maior mortalidade confirmada acumulada ao 5º dia foram selecionados para serem testados quanto à sua virulência, concentração letal, crescimento vegetativo, produção de conídios em placa, produção de conídios em arroz e produção de conídios em cadáver, sendo que os dados foram analisados graficamente.

Comparação da Virulência. Os isolados foram multiplicados conforme metodologia já descrita, e

foram preparadas suspensões de conídios nas concentrações de 1,0×10⁴, 1,0×10⁵, 1,0×10⁶, 1,0×10⁷, 1,0×10⁸ e 1,0×10⁹ conídios/mL, utilizando-se o mesmo procedimento experimental adotado no experimento anterior. A mortalidade foi avaliada diariamente por 10 dias, padronizando-se para análise os valores de mortalidade confirmada obtidos no 5º e 10º dias após a inoculação, conforme realizado por Rohde *et al.* (2006).

Os dados foram transformados em arcseno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância (Teste *F*) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ambos a 5% de significância, segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se os programas estatísticos Sisvar® (Ferreira 2005).

Crescimento vegetativo. Os conídios foram inoculados em dois pontos na superfície do meio de cultura (M.E.) em placas de Petri, incubadas a 26±1°C e 14h de fotofase, durante 8 dias. Após esse período, foram realizadas duas medições perpendiculares do diâmetro das colônias formadas, para obtenção do diâmetro médio. Para cada um dos isolados foram preparadas quatro placas, sendo cada colônia considerada uma repetição.

Os dados foram transformados em \sqrt{x} e submetidos à análise de variância (Teste *F*) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ambos a 5% de significância, segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se o programa estatístico Sisvar®.

Produção de conídios em placa. Os dados foram obtidos a partir das colônias do experimento anterior, que foram recortadas do meio de cultura na linha terminal do halo e individualizadas em tubos de vidro esterilizados, e armazenadas a -10°C. Para a avaliação,

as colônias foram imersas em 10mL de solução de água destilada esterilizada + espalhante adesivo Tween 80 (0,01%) e agitadas em vórtex por um minuto. A quantificação foi feita em câmara de Neubauer e os dados obtidos foram transformados em \sqrt{x} e submetidos à análise descrita para o experimento de avaliação de crescimento vegetativo.

Produção de conídios em arroz. Seguiu-se a metodologia descrita por Leite *et al.* (2003) para a preparação dos inóculos, matrizes e incubação. Cada repetição constou da inoculação de aproximadamente 15g do arroz + fungo das matrizes, em 150g de arroz pré-cozido, autoclavado e resfriado contido em um saco de polipropileno. Para cada isolado foram preparadas dez repetições e foram incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 14h de fotofase. Após 10 dias os sacos foram abertos e seu conteúdo exposto a um fluxo de ar durante o período de 24 horas, sendo então, o arroz espalhado em bandejas de plástico e mantido a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por mais três dias, para então se avaliar a produção de conídios.

Assim, três amostras de 1g do arroz foram tomadas de cada repetição e armazenadas a -10°C . Posteriormente, foram suspensas em água destilada esterilizada + espalhante adesivo Tween 80 (0,01%) e agitadas em vórtex por um minuto para serem submetidas à contagem em câmara de Neubauer. O delineamento experimental e a análise estatística adotados foram os mesmos descritos no experimento de avaliação de crescimento vegetativo.

Produção de conídios em cadáver. Todos os procedimentos adotados foram os mesmos descritos no experimento de avaliação de patogenicidade, utilizando-se, porém, o total de sete repetições por isolado, cada uma constituída por sete insetos, selecionados com base na plena conidiogênese, após os cadáveres terem sido mantidos em câmara úmida, conforme também descrito. Os insetos foram acondicionados em frascos de vidro esterilizados e armazenados em freezer a -10°C até a realização da contagem.

Para a avaliação, os conídios da superfície dos insetos foram removidos, imergindo os insetos em 10mL de água destilada estéril + espalhante adesivo Tween 80 (0,01%). A suspensão foi agitada em vórtex durante um minuto e quantificada em câmara de Neubauer. A análise dos dados foi executada com base nos procedimentos descritos para o experimento de avaliação do crescimento vegetativo.

Resultados e Discussão

Avaliação da Patogenicidade. Verificou-se que todos os isolados foram patogênicos a *S. zeamais*, sendo que o isolado Esalq 643 foi o que causou a maior porcentagem de mortalidade confirmada (98,3%),

seguido pelo Unioeste 4 (95%), ambos da espécie *B. bassiana* (Tabela 2). Também utilizando o mesmo isolado Moino Jr. *et al.* (1998) obtiveram resultados semelhantes, com porcentagem média de mortalidade para *S. zeamais* entre 56,7 a 100% e para *S. oryzae* entre 33,3 a 100%. Ressaltaram que o isolado Esalq 643 foi o segundo melhor, dentre 72 isolados analisados, apresentando mortalidade média de 86,7% para *S. zeamais* e 96,7% para *S. oryzae*.

Tabela 2. Porcentagem média de mortalidade confirmada de adultos de *S. zeamais* por diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* após 10 dias de incubação ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 14h de fotofase).

| Isolados | Mortalidade (%) |
|--------------------------------------|-----------------|
| <i>Beauveria bassiana</i> | |
| Unioeste 1 | 45,0 \pm 2,1 |
| Unioeste 3 | 8,3 \pm 0,8 |
| Unioeste 4 | 95,0 \pm 0,7 |
| Unioeste 5 | 71,7 \pm 2,4 |
| Unioeste 25 | 28,3 \pm 1,4 |
| Unioeste 26 | 71,7 \pm 1,2 |
| Unioeste 36 | 80,0 \pm 1,8 |
| Unioeste 37 | 78,3 \pm 2,0 |
| Unioeste 38 | 35,0 \pm 0,8 |
| Unioeste 39 | 83,3 \pm 2,5 |
| Unioeste 40 | 70,0 \pm 0,5 |
| Unioeste 41 | 86,7 \pm 1,4 |
| Unioeste 42 | 43,3 \pm 2,1 |
| Unioeste 44 | 91,7 \pm 0,8 |
| Unioeste 45 | 90,0 \pm 2,1 |
| Esalq 643 | 98,3 \pm 0,5 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> | |
| Unioeste 22 | 65,0 \pm 1,1 |
| Unioeste 43 | 33,3 \pm 0,7 |

Os isolados Unioeste 4, Unioeste 36, Unioeste 39, Unioeste 41, Unioeste 44, Unioeste 45 e Esalq 643, foram selecionados com base na interpretação gráfica, pois causaram mortalidade confirmada em *S. zeamais* mínima de 80%, sendo todos isolados do fungo *B. bassiana*. Dentre estes, os três isolados que apresentaram maior porcentagem de mortalidade confirmada acumulada ao 5º dia após a inoculação foram Unioeste 4 (78,3%), Unioeste 39 (71,7%) e Esalq 643 (63,3%) (Fig. 1), sendo utilizados nas etapas posteriores.

Comparação da Virulência. Os dados obtidos neste experimento não se ajustaram ao modelo proposto pelo Probit, optando-se assim, pela comparação de médias de mortalidade, sendo o mesmo procedimento adotado por Rohde *et al.* (2006), selecionando isolados de fungos entomopatogênicos para *A. diaperinus*. Assim, analisaram-se médias de porcentagem de mortalidade confirmada no 5º e no 10º dia após inoculação, complementando o estudo comparativo com análise de outros parâmetros biológicos.

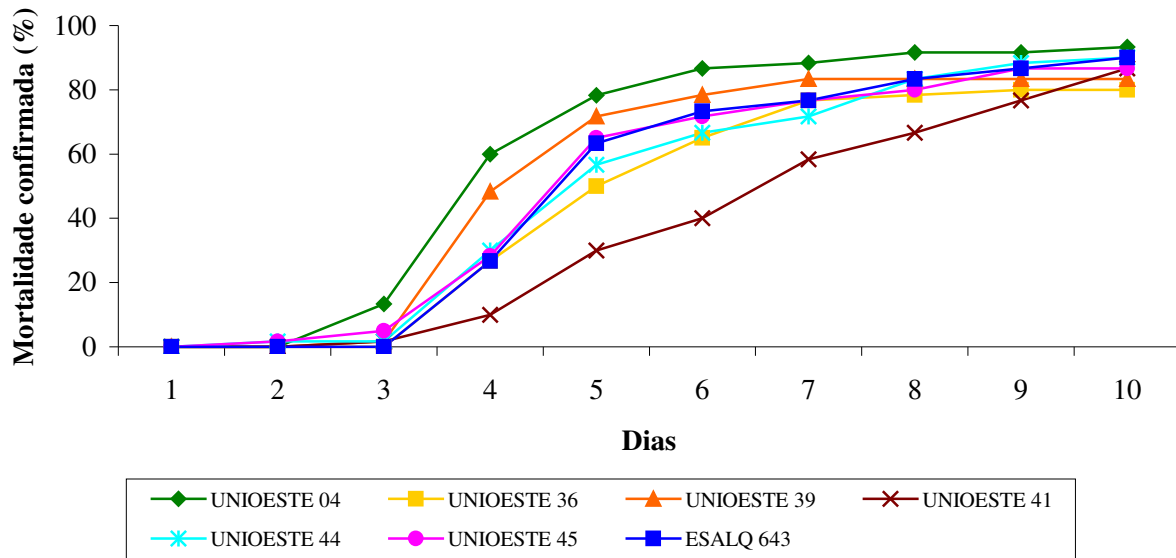


Figura 1. Mortalidade confirmada acumulada de adultos de *S. zeamais* por isolados de *B. bassiana* ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14h de fotofase).

Segundo Haddad (1998), a estimativa da CL_{50} com a utilização do teste de Probit, em testes envolvendo entomopatógenos, nem sempre é possível, pois os bioensaios não são do tipo estímulo-resposta, como ocorre com inseticidas químicos, por isso muitas vezes os dados não se enquadram ao modelo.

Neste experimento, verificou-se que todos os isolados apresentaram diferença significativa na mortalidade confirmada, conforme a variação da concentração de conídios, sendo que com o aumento da concentração ocorreu aumento na mortalidade (Tabela 3).

Ao 5º dia, a mortalidade confirmada de *S. zeamais* ocasionada pelo isolado Unioeste 4, variou de 1,7 a 61,7%, e ao 10º dia a variação esteve entre 3,3 e 95,1%, sendo a maior mortalidade atribuída a maior concentração ($1,0\times 10^9$ conídios/mL), no entanto, ao 5º dia esta concentração não diferiu significativamente da concentração de $1,0\times 10^8$ conídios/mL.

O isolado Unioeste 39 causou uma variação na mortalidade confirmada ao 5º dia de 1,7 a 76,7%. A variação apresentada no 10º dia esteve entre 5,0 e 91,7%, sendo que em ambos os casos a concentração de $1,0\times 10^9$ conídios/mL foi significativamente mais expressiva que as demais.

O isolado Esalq 643 provocou uma variação de 3,3 a 50,0% na mortalidade confirmada ao 5º dia, e 5,0 a 78,3% ao 10º dia, sendo que em ambos os casos, a concentração de $1,0\times 10^9$ conídios/mL foi significativamente superior as demais.

Verificou-se que, independente do tempo de incubação, *S. zeamais* apresentou baixa mortalidade quando inoculado com isolados de *B. bassiana* nas concentrações $1,0\times 10^4$, $1,0\times 10^5$, $1,0\times 10^6$ e $1,0\times 10^7$ conídios/mL. Assim, as concentrações inferiores a $1,0\times 10^8$,

para os isolados aqui testados, não são recomendadas para ensaios de seleção de fungos para este inseto (Fig. 2).

Apesar do isolado Unioeste 39 apresentar mortalidade média de 76,7% ao 5º dia, sendo a maior mortalidade verificada, este não diferiu significativamente dos isolados Unioeste 4 (61,7%) e Esalq 643 (50,0%). Pode-se observar também, que para o mesmo dia e mesma concentração, a mortalidade não diferiu significativamente entre os isolados, sendo que todos apresentam potencial para utilização em programas de controle biológico de *S. zeamais*.

Avaliando a CL_{50} de dois isolados de *B. bassiana* para controle de *S. zeamais* e *S. oryzae*, Moino Jr. & Alves (1997) utilizaram inoculações em pó, nas concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0g de conídios/100g de grãos de arroz. Os autores verificaram que para *S. oryzae* não houve diferença entre os isolados dentro da mesma concentração, sendo que a CL_{50} para este inseto foi de 0,1g de conídios/100g de grãos. Contudo, na avaliação da CL_{50} , estes diferiram entre si, sendo que o isolado 604 apresentou menor CL_{50} (0,01g de conídios/100g) comparado ao isolado 476 (0,05g de conídios/100g de grãos). Porém, são dados de difícil comparação, pois não apresentam a concentração de conídios no tratamento (líquido ou pó) e sim em relação ao substrato onde estavam os insetos.

No entanto, Kassa *et al.* (2002), avaliando a CL_{50} de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* para controle de *S. zeamais*, utilizaram inoculações líquidas, verificando, ao contrário dos resultados aqui obtidos, que o isolado de *M. anisopliae* apresentou a menor CL_{50} ($2,0\times 10^5$ conídios/mL), em relação aos isolados de *B. bassiana* ($2,0\times 10^6$ conídios/mL).

Comparando-se a mortalidade de *S. zeamais* ao 5^o e ao 10^o dia após a inoculação, dentro de cada concentração, para cada isolado, apenas Esalq 643 mostrou diferença significativa entre os dois dias para as concentrações de $1,0 \times 10^7$ (3,3% para o 5^o dia e 16,7% para o 10^o dia) e $1,0 \times 10^8$ (18,3% para o 5^o dia e 45,0% para o 10^o dia), sendo que os demais isolados e as demais concentrações não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

Crescimento Vegetativo. O isolado Esalq 643 apresentou o maior diâmetro médio de colônia, 4,5cm, quando comparado aos isolados Unioeste 04 (3,4cm) e Unioeste 39 (com 3,3cm) (Fig. 3, Tabela 4).

Ao contrário dos valores aqui obtidos, Alexandre *et al.* (2006) verificaram média de 1,35cm no diâmetro das colônias de isolados de *B. bassiana* após 10 dias de incubação a 26°C, sendo valores inferiores aos do presente trabalho.

Tabela 3. Porcentagem média de mortalidade confirmada (\pm EP) de adultos *S. zeamais* submetidos a diferentes concentrações de conídios de *B. bassiana* ao 5^o e ao 10^o dia após inoculação (26 \pm 1°C, 14h de fotofase).

| Concentrações de conídios/mL | Isolados | | | | | |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|
| | Unioeste 4 | | Unioeste 39 | | Esalq 643 | |
| | 5 ^o | 10 ^o | 5 ^o | 10 ^o | 5 ^o | 10 ^o |
| 1×10^4 | 1,7 \pm 0,42Ba | 5,0 \pm 0,42Ca | 1,7 \pm 0,48Ca | 6,7 \pm 0,42Ca | 3,3 \pm 0,48Ba | 5,0 \pm 0,42Ca |
| 1×10^5 | 1,7 \pm 0,42Ba | 3,3 \pm 0,48Ca | 1,7 \pm 0,42Ca | 5,0 \pm 0,80Ca | 5,0 \pm 0,80Ba | 10,0 \pm 0,48Ca |
| 1×10^6 | 5,0 \pm 0,80Ba | 11,7 \pm 1,85Ca | 5,0 \pm 0,80BCa | 10,0 \pm 1,98Ca | 5,0 \pm 1,25Ba | 5,0 \pm 1,25Ca |
| 1×10^7 | 3,3 \pm 0,48Ba | 10,0 \pm 0,48Ca | 3,3 \pm 0,48Ca | 11,7 \pm 1,05Ca | 3,3 \pm 0,48Ba | 16,7 \pm 0,48BCa ¹ |
| 1×10^8 | 18,3 \pm 1,85Aa | 48,3 \pm 2,67Ba | 21,7 \pm 1,42Ba | 45,0 \pm 1,58Ba | 18,3 \pm 1,25Ba | 45,0 \pm 0,42Aba ¹ |
| 1×10^9 | 61,7 \pm 1,25Aa | 95,1 \pm 0,78Aa | 76,7 \pm 2,21Aa | 91,7 \pm 1,58Aa | 50,0 \pm 3,54Aa | 78,3 \pm 2,29Aa |
| CV (%) | 41,21 | | | | | |

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen(\sqrt{x/100})$.

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na linha nos dias correspondentes, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹Médias com diferença para o mesmo isolado entre os dois dias de avaliação, pelo teste de Tukey (P<0,05).

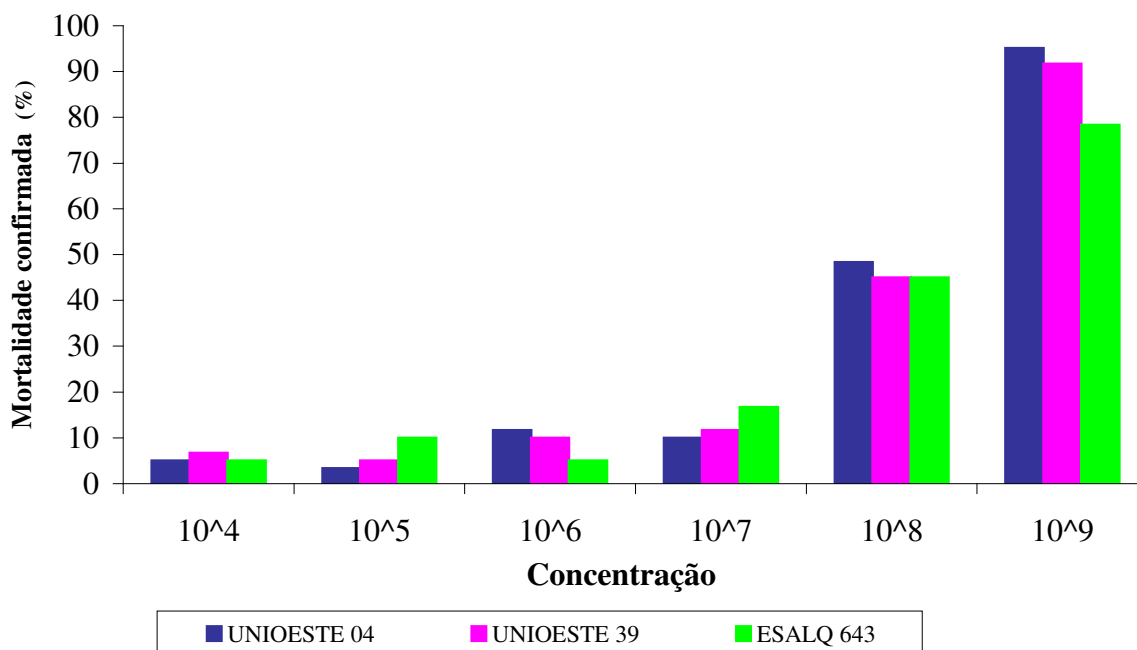


Figura 2. Porcentagem média de mortalidade de *S. zeamais*, submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*, após 10 dias de incubação (26 \pm 1°C, 14h de fotofase).

Tabela 4. Diâmetro médio e produção média de conídios em colônias (\pm EP) de diferentes isolados de *B. bassiana* em meio de cultura, após 8 dias de incubação ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14h de fotofase).

| Isolados | Diâmetro médio das colônias (cm) | Produção média de conídios/colônia ¹ | Produção média de conídios/cm ² ² |
|-------------|----------------------------------|---|---|
| Unioeste 4 | 3,4 \pm 0,08B | 1,6 \pm 0,25B | 1,6 \pm 0,21A |
| Unioeste 39 | 3,3 \pm 0,11B | 1,3 \pm 0,25B | 1,7 \pm 0,33A |
| Esalq 643 | 4,5 \pm 0,03A | 4,8 \pm 0,74A | 3,0 \pm 0,46A |
| CV (%) | 2,32 | 16,51 | 22,29 |

¹Número médio de conídios por colônia $\times 10^8$; ² número médio de conídios por cm² $\times 10^7$

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} .

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05).

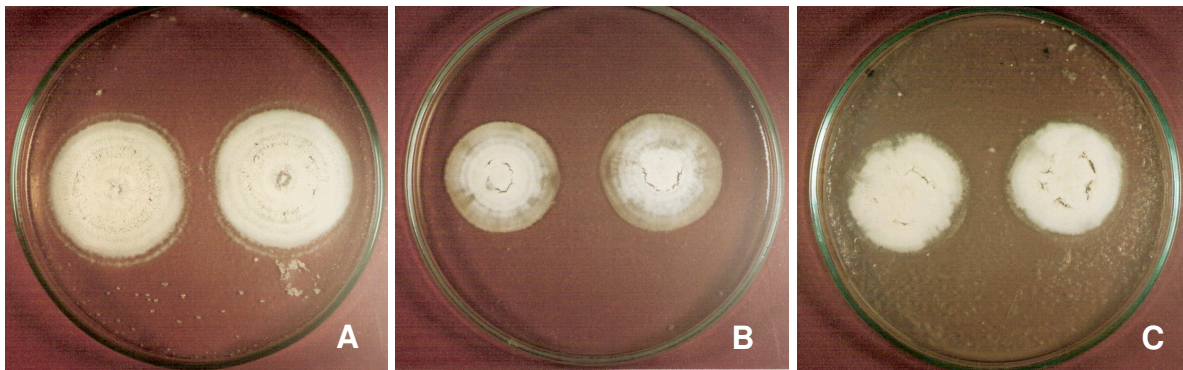


Figura 3. Colônias de isolados de *B. bassiana*: A) Unioeste 4, B) Esalq 643 e C) Unioeste39, cultivados em M.E., após 8 dias de incubação ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 14h de fotofase).

No entanto, valores semelhantes aos aqui apresentados, foram verificados por Rohde *et al.* (2006), sendo que o maior valor obtido foi 4,3cm, após 10 dias de incubação. Estes autores também testaram o isolado Unioeste 4, que apresentou diâmetro médio de colônia de 3,8cm.

As pequenas variações podem ser ocasionadas pelo fotoperíodo, temperatura e umidade relativa, além das variações no tempo de incubação, no tipo e na espessura do meio de cultura utilizado e no tempo de armazenamento do isolado. Também leva-se em conta a quantidade de conídios presentes na agulha no ato da repicagem e a variabilidade genética dos isolados. Alguns fatores são controlados e padronizados, outros não, e pequenas variações podem interferir significativamente nos resultados.

Produção de conídios em placa de Petri. O isolado Esalq 643 diferiu significativamente dos demais, apresentando concentração média de $4,8 \times 10^8$ conídios/colônia, contra $1,6 \times 10^8$ conídios/colônia do isolado Unioeste 4 e $1,3 \times 10^8$ conídios/colônia do isolado Unioeste 39. No entanto, em relação à produção média de conídios/cm², este isolado não diferiu dos demais (Fig. 4, Tabela 4).

Valores superiores aos obtidos neste trabalho foram apresentados por Batista Filho *et al.* (2001), que obtiveram produção de $9,8 \times 10^8$ conídios/colônia para *B. bassiana* e por Rohde *et al.* (2006) com variação de $3,8 \times 10^8$ a $3,4 \times 10^9$ conídios/colônia, sendo que este

último dado é referente ao isolado Unioeste 4, que no presente trabalho apresentou a média de $1,6 \times 10^8$. Rohde *et al.* (2006) obtiveram produção média do isolado Unioeste 4 de $3,2 \times 10^8$ conídios/cm², representando 20 vezes a produção obtida neste experimento ($1,6 \times 10^7$ conídios/cm²). Como citado anteriormente, são vários os fatores que podem afetar a produção, no entanto, observações posteriores demonstraram a diminuição gradativa na capacidade de produção de conídios deste isolado (dados não publicados). No entanto, Alexandre *et al.* (2006) obtiveram valores de produção de conídios/colônia inferiores aos aqui apresentados, variando entre $2,0 \times 10^7$ a $7,0 \times 10^7$ conídios/colônia. Essa diferença provavelmente esteja relacionada ao menor diâmetro de colônia verificado por estes autores.

Constatou-se, para em todos os isolados, que a variação na quantidade de conídios/colônia coincidiu com a medida do diâmetro médio das mesmas, de forma que nas maiores colônias a concentração de conídios sempre foi maior, sendo o isolado Esalq 643 superior em relação aos demais.

No entanto, comparando estes valores com a produção média de conídios/cm², essa tendência não foi observada, e desta forma, pode-se concluir que o isolado que apresenta maior diâmetro de colônia nem sempre irá apresentar uma maior produção de conídios (Tabela 4).

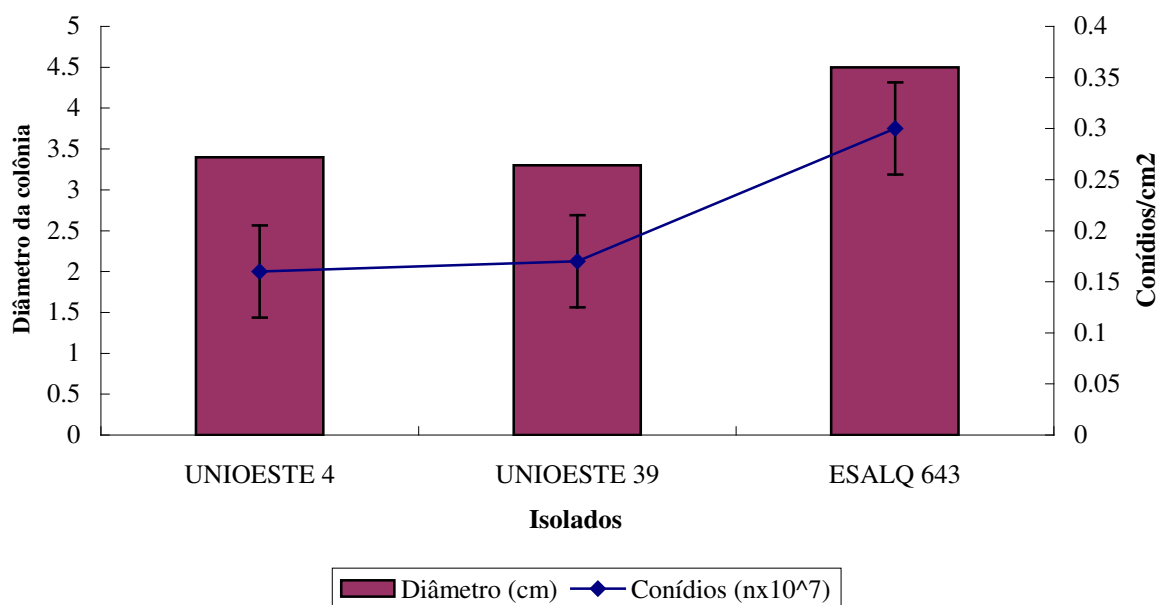


Figura 4. Crescimento vegetativo e produção de conídios em meio de cultura de isolados de fungos entomopatogênicos ($26 \pm 1^\circ C$, 14h de fotofase).

Produção de conídios em arroz. O isolado Esalq 643 produziu $10,4 \times 10^7$ conídios/g de arroz e o isolado Unioeste 4 apresentou $7,8 \times 10^7$ conídios/g de arroz, sendo estes isolados significativamente superiores ao isolado Unioeste 39 ($4,3 \times 10^7$ conídios/g) (Tabela 5). No entanto, estes valores foram inferiores aos citados por Alves & Pereira (1998) e Leite *et al.* (2003) que afirmaram que a produção deve ser próxima a 10^{10} ou 10^{11} conídios/g.

Rohde *et al.* (2006) verificaram que a produção do isolado Unioeste 04 foi maior em relação aos demais isolados, apresentando uma média de $8,3 \times 10^8$ conídios/g de arroz. Apesar do isolado Unioeste 04 obter uma das maiores produções no presente trabalho, o valor resultante corresponde a uma produção cerca de 10 vezes menor do que a obtida por estes autores.

Apesar do método utilizado para produção ser baseado no citado por Alves & Pereira (1998) e Leite *et al.* (2003), a diferença pode estar relacionada a fatores que envolvem pequenas variações no substrato, o método de produção empregado, como o tempo de pré-cozimento do arroz, teor de umidade, tempo e condições de incubação, bem como a quantidade de subs-

trato dentro de cada recipiente e a quantidade de inóculo aplicado. Além desses fatores, a qualidade do arroz utilizado no experimento e a qualidade do inóculo empregado, são fatores que podem explicar a variação.

Produção de conídios em cadáver. Todos os isolados apresentaram conidiogênese sobre os cadáveres de *S. zeamais*, no entanto, o isolado Esalq 643 mostrou mais uma vez superioridade em relação aos demais, apresentando produção média de $2,6 \times 10^7$ conídios/cadáver (Tabela 5).

Neves & Hirose (2005) também obtiveram variações na produção média de conídios/cadáver em *Hypothenemus hampei*, para os diferentes isolados de *B. bassiana* analisados. Da mesma forma, Alexandre *et al.* (2006) e Rohde *et al.* (2006) observaram variações na produção de conídios/cadáver para *A. diaperinus*, em relação aos diferentes isolados testados. Além disso, Alexandre *et al.* (2006) compararam a produção de conídios/cadáver de *A. diaperinus* em diferentes temperaturas, sendo este um fator também importante na conidiogênese.

Tabela 5. Número médio de conídios em arroz e em cadáveres (\pm EP) de *S. zeamais* ($26 \pm 1^\circ C$, 14h de fotofase).

| Isolados | Produção média de conídios/arroz/g ¹ | Produção média de conídios/cadáver ² |
|-------------|---|---|
| Unioeste 4 | $7,8 \pm 0,69A$ | $1,5 \pm 0,12B$ |
| Unioeste 39 | $4,3 \pm 0,24B$ | $1,6 \pm 0,20B$ |
| Esalq 643 | $10,4 \pm 1,15A$ | $2,6 \pm 0,27A$ |
| CV (%) | 15,25 | 8,49 |

¹Número médio de conídios por grama de arroz $\times 10^7$; ² número médio de conídios por cadáver $\times 10^7$. Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} .

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Assim, pode-se concluir que o isolado Esalq 643 destacou-se como o mais eficiente no controle do inseto, sendo também o mais produtivo, coincidindo com as observações de Moino Jr. *et al.* (1998). No entanto, o isolado Unioeste 4 provocou elevada porcentagem de mortalidade, além de boa produção de conídios/g de arroz, tendo também potencial para o controle de *S. zeamais*.

Literatura Citada

- Alexandre, T.M., L.F.A. Alves, P.M.O.J. Neves & S.B. Alves. 2006. Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotrop. Entomol. 35: 75-82.
- Alves, S.B. 1998a. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens, p. 21-37. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. 1998b. Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1998a. 1163p.
- Alves, S.B. & R.E. Lecuona. 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p. 97-169. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. & R.M. Pereira. 1998. Produção de fungos entomopatogênicos, p. 845-869. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998. Técnicas de laboratório. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Andrade Jr., A.S., A.A. Santos, C.A. Sobrinhos, E.H. Bastos, F.B. Melo, F.M.P. Viana, F.R. Freire Filho, J.S. Carneiro, M.M. Rocha, M.J. Cardoso, P.H.S. Silva & V.Q. Ribeiro. 2003. Pragas de grãos armazenados. Embrapa Meio-Norte, Sistemas de Produção 2. Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em 20 out. 2005.
- Batista Filho, A.B., J.E.M. Almeida & C. Lamas. 2001. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. Neotrop. Entomol. 30: 437-447.
- Caneppele, M.A.B., C. Caneppele, F.A. Lazzari & S.M.N. Lazzari. 2003. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). Rev. Bras. Entom. 47: 625-630.
- Castrillo, L.A., D.W. Roberts & J.D. Vandenberg. 2005. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. J. Invert. Pathol. 89: 46-56.
- Dal Bello, G., S. Padín, C. López Lastra & M. Fabrizio. 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. J. Stored Prod. Res. 37: 77-84.
- Ferreira, D.F. 2005. Sistema Sisvar para análises estatísticas. Disponível em <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>> Acesso em 23 de dez. 2005.
- Haddad, M.L. 1998. Utilização do Polo-PC para análises de Probit, p. 999-1013. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Kassa, A., G. Zimmermann, D. Stephan & S. Vidal. 2002. Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to Entomopathogenic Fungi from Ethiopia. Biocontrol Science and Technology. v.12, n.6, p.727-736, dec. /Abstract/
- Lacey, L.A., R. Frutos, H.K. Kaya & P. Vails. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biological Control. 21: 230-248.
- Leite, L.G., A. Batista Filho, J.E.M. Almeida & S.B. Alves. 2003. Produção de Fungos Entomopatogênicos. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 92p.
- Lord, J.C. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. J. Invert. Pathol. 89: 19-29.
- Moino Jr., A. & S.B. Alves. 1997. Determinação de concentração de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de insetos-pragas de grãos armazenados. An. Soc. Entomol. Bras. 26: 15-19.
- Moino Jr., A. & S.B. Alves. 1998. Efeito de *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Sitophilus zeamais*. Manejo Integrado de Pragas. 50: 51-54.
- Moino Jr., A., S.B. Alves & R.M. Pereira. 1998. Efficacy of *Beauveria bassiana* (balsamos) Vuillemin isolates for control of stores-grains pests. J. Appl. Entomol. 122: 301-305.
- Neves, M.O.J. & E. Hirose. 2005. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Neotrop. Entomol. 34: 77-82.
- Padín, S., G. Dal Bello & M. Fabrizio. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. J. Stored Prod. Res. 38: 69-74.
- Parra, J.R.P., P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento. 2002. O futuro do controle biológico, p. 581-587. In: J.R.P. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (Eds.) Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores. São Paulo: Manole, 609p.
- Pereira, R.M., S.B. Alves & P.R. Reis. 1998. Segurança no emprego de entomopatogênicos. p.171-194. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1998a. 1163p.
- Rohde, C., L.F.A. Alves, D.F. Bressan, P.M.O.J. Neves, S.B. Alves, D.O. Pinto & J.E.M. Almeida. 2006. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotrop. Entomol. 35: 231-240.