



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRICIA HELENA SANTORO

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO E DE CULTIVOS SUCESSIVOS
IN VIVO E *IN VITRO* SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS
DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL.**

Londrina
2011

PATRICIA HELENA SANTORO

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO E DE CULTIVOS SUCESSIVOS
IN VIVO E *IN VITRO* SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS
DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira
Janeiro Neves

Londrina
2011

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237i Santoro, Patrícia Helena.
Influência da nutrição e de cultivos sucessivos *in vivo* e *in vitro* sobre parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. / Patrícia Helena Santoro. – Londrina, 2011.
122 f. : il.

Orientador: Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. *Alphitobius diaperinus* – Teses. 2. Controle biológico – Teses. 3. Fungo entomopatogênico – Teses. 4. Virulência – Teses. I. Neves, Pedro Manuel Oliveira Janeiro. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 632.937

PATRICIA HELENA SANTORO

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO E DE CULTIVOS SUCESSIVOS *IN VIVO*
E *IN VITRO* SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Beauveria*
bassiana (BALS.) VUILL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Moscardi
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida
Instituto Biológico – SP

Prof. Dr. Luís Francisco Algeli Alves
UNIOESTE – PR

Prof. Dr. Maurício Urso Ventura
UEL – Londrina – PR

Prof. Ayres Menezes de Oliveira Júnior
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Amarildo Pasini
UEL – Londrina – PR

Prof. Dra. Laila Herta Mihsfeldt
FFALM – Bandeirantes – PR

Prof. Dr. Pedro M. O. J. Neves
UEL – Londrina – PR

Londrina, 4 de julho de 2011.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas nossas vidas e por Sua presença em todos os instantes.

Aos meus pais, pela educação e amor que sempre me deram.

Ao Prof. Pedro Neves, por me orientar por mais de 12 anos, pelos ensinamentos transmitidos, apoio, colaboração e por me conduzir para o caminho da pesquisa.

A todos os professores do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pela minha formação durante a graduação, mestrado e doutorado.

À Janaína Zorzetti, Kelly Constanski e Junio Amaro, alunos da Pós-Graduação em Agronomia, que sempre me ajudaram na condução deste trabalho.

À Prof. Inês Fonseca de UEL e à Dr. Inês Fumiko Ubukata Yada da Área de Biometria do Iapar, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao CNPq, por conceder a bolsa de estudos durante os primeiros anos do curso.

À professora Maria Helena Fungaro, por disponibilizar seu laboratório para as análises de RAPD.

À Rosinei Aparecida de Souza, técnica do Laboratório de Solos do Iapar, pelas análises químicas dos condidos.

Ao meu namorado Marcelus Palhares, pelo auxílio na formatação das referências bibliográficas e apoio.

Ao Davi Tramontina, técnico do Lab. de Entomologia; ao Márcio Praxedes, técnico do Lab. de Solos; ao José Rocha, técnico do Lab. de Fitopatologia; e à Weda Westin, secretária da Pós Graduação em Agronomia, pela disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SANTORO, Patricia Helena. **Influência da nutrição e de sucessivos cultivos *in vivo* e *in vitro* sobre parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.** 2011. 122 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A eficiência do controle biológico de artrópodos com fungos entomopatogênicos depende da alta produção de propágulos infectivos, que tenham alta virulência e que sejam menos suscetíveis aos fatores abióticos, como temperatura elevada e radiação UV. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver meios de cultivo para a produção de *Beauveria bassiana*, avaliar a influência das condições nutricionais do meio, de sucessivos cultivos *in vitro* e de passagens do fungo pelo hospedeiro, em relação à qualidade do patógeno, expressa pelo crescimento vegetativo, produção de conídios, virulência e tolerância à temperatura e à radiação UV. Foram testados meios desenvolvidos a partir de soluções nutritivas para plantas (SNS e SNH) e meio a base de insetos (*Alphitobius diaperinus*) triturados (MAD). Os sucessivos cultivos ocorreram em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD. Inicialmente o fungo foi passado pelo hospedeiro, cultivado por 17 vezes nos diferentes meios, e novamente passado pelo inseto. Ao avaliar o efeito das sucessivas passagens do fungo pelo hospedeiro, foram utilizados três isolados passados 15 vezes por adultos de *A. diaperinus*. Os resultados indicam que os meios MAD 10%, SNS 25% e SNH 25% favorecem alta produção de conídios, e esta característica varia entre isolados. A tolerância à temperatura foi positivamente correlacionada com os teores de K, C e relação C:N endógena nos conídios. O aumento do teor de enxofre influenciou negativamente a produção, a virulência e a tolerância à UV. O método de análise química de tecido vegetal pode ser utilizado para a caracterização química dos conídios, e os teores dos elementos são influenciados pelo substrato em que o fungo é produzido. Os sucessivos cultivos e as condições nutricionais do meio afetaram a qualidade do fungo. A atenuação do crescimento vegetativo e da produção de conídios foi menos acentuada após os cultivos em MAD. Os conídios produzidos em BDA mantiveram a tolerância à temperatura inalterada após os cultivos. *B. bassiana* foi suscetível à radiação UV, porém esta característica não foi afetada pelos cultivos *in vitro*. A virulência, a produção e a tolerância à temperatura, que foram atenuadas pelos cultivos *in vitro*, puderam ser restauradas após uma única passagem do fungo pelo inseto. As sucessivas passagens do fungo pelo hospedeiro afetaram a qualidade dos conídios, que variou entre os isolados. De maneira geral, houve redução do crescimento vegetativo, aumento da produção de conídios em arroz, da virulência e da tolerância à temperatura, após as passagens pelo hospedeiro, porém a tolerância à radiação UV foi reduzida. Estes resultados mostram que é possível melhorar a qualidade do fungo por meio da manipulação das condições nutricionais durante o cultivo e das passagens pelo hospedeiro, o que pode contribuir para o aumento da eficiência de controle no campo.

Palavras-chave: *Alphitobius diaperinus*. Controle biológico. Fungo entomopatogênico. Produção de conídios. Tolerância à radiação UV. Tolerância à temperatura. Virulência.

SANTORO, Patricia Helena. **Influence of nutrition and successive subculturing *in vivo* and *in vitro* on biological parameters of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in conidial quality.** 2011. 122 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The biological control of arthropods using entomopathogenic fungi depends on the large scale production of infective conidia, that should be high virulent and resistant to abiotic factors such as high temperature and UV radiation. The objectives of this study were to develop a culture medium for *B. bassiana* production, evaluate the influence of nutritional conditions of the media, of successive subculture *in vitro* and successive subculture of the fungus in the host regarding the pathogen stability, expressed by vegetative growth, conidial production, virulence and temperature and UV radiation tolerance. Tested culture media were developed from plants nutrient solutions (SNS and SNH) and medium made of crushed insects (*Alphitobius diaperinus*) (MAD). The successive subculture were made on PDA (potato dextrose agar) and MAD. Initially the fungus was successively subcultured by 17 times in the host, and in different media, and again subculture in the insect. To assess the effect of successive subculturing by the host, three isolates were used, after 15 times subcultured in adults of *A. diaperinus*. The results show that the media 10% MAD, SNS 25% and SNH 25% gave high conidial yield, a characteristic that varies among isolates. The temperature tolerance was positively correlated with K, C and C: N ratio in endogenous conidia. The increase in the sulfur content negatively affected conidial yield, virulence and tolerance to UV. Plant tissue chemical analysis method can be used for chemical characterization of conidia. Successive subculturing and nutritional conditions of the medium affected the fungus stability. Decrease in vegetative growth and conidial yield was less pronounced after subculture in MAD. Conidial yield in PDA maintained temperature tolerance unchanged after successive subcultures. *B. bassiana* was sensible to UV radiation, but this characteristic was not affected by *in vitro* subculture. The virulence, conidial yield and tolerance to temperature, which were attenuated by *in vitro* subculture, could be restored after a single subculture of the fungus in the insect. Successive subcultures of the fungus in the host affect conidial stability, which varied among isolates. Overall, there was a reduction in vegetative growth, increased in conidial yield on rice, and in virulence and tolerance to temperature, after subcultured in the host, but the tolerance to UV radiation was reduced. These results show that it is possible to improve fungus quality through by manipulation of nutritional conditions and by successive subculturing in the host, which may contribute to increasing the control efficiency in the field.

Keywords: *Alphitobius diaperinus*. Biological control. Conidial yield. Entomopathogenic fungi. Virulence. Tolerance to temperature. Tolerance to UV radiation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1** – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, constituído por isolados de *Beauveria bassiana*, com diferentes hospedeiros e origem geográfica. 50
- Figura 4.2** – Crescimento vegetativo *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=8,79%), CG 481 (CV=6,00%) e Unioeste 4 (CV=7,10%)] em diferentes meios e concentrações, após 14 dias de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios uma mesma concentração, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); SNS e SNH: meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente. 52
- Figura 4.3** – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios colônia⁻¹) *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=19,82%), CG 481 (18,97%) e Unioeste 4 (CV=23,81%)] em diferentes meios e concentrações, após 14 dias de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios uma mesma concentração, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); SNS e SNH: meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente. 54
- Figura 4.4** – Crescimento vegetativo *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=3,56), CG 481 (CV=4,31) e Unioeste 4 (CV=5,17)] no meio MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), em diferentes concentrações e tempos de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo tempo de incubação, e maiúsculas comparam os tempos de incubação em uma mesma concentração,

- pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$)..... 57
- Figura 4.5** – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios colônia⁻¹) *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=17,71), CG 481 (CV=19,08) e Unioeste 4 (CV=19,61)] no meio MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), em diferentes concentrações e tempos de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo tempo de incubação, e maiúsculas comparam os tempos de incubação em uma mesma concentração, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$)..... 59
- Figura 4.6** – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* em arroz cozido em calda com insetos triturados e soluções nutritivas, em diferentes concentrações, após 15 dias de incubação; letras minúsculas comparam os meios para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em um mesmo meio, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=11,78%); MAD (calda a base de *Alphitobius diaperinus*); SNS e SNH (caldas a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente). 60
- Figura 4.7** – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus*, por conídios de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzidos em diferentes meios, ao décimo dia após a aplicação; letras minúsculas comparam os meios para a mortalidade total (CV=21,58%), e maiúsculas comparam os meios para a mortalidade confirmada (CV=22,52%), ambas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); MAD (meio de *Alphitobius diaperinus* a 10%); SNS e SNH (meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, a 25%, respectivamente); BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporo de *Beauveria* spp). 62
- Figura 4.8** – Viabilidade de conídios (germinação %) de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzidos em diferentes meios após armazenagem a 30°C por diferentes tempos (dias); letras minúsculas

comparam os tempos para um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 5,15\%$); MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*); SNS e SNH (meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente); BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporo de *Beauveria* spp)..... 64

Figura 4.9 – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzida em diferentes meios, após exposição à radiação UV por diferentes tempos; letras minúsculas comparam os tempos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 11,06\%$); MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*); SNS e SNH (meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente); BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporo de *Beauveria* spp)..... 66

Figura 5.1 – Crescimento vegetativo (cm^2) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 11,01\%$); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro. 85

Figura 5.2 – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios $col\acute{o}nia^{-1}$) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos no mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 19,30$); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro..... 86

- Figura 5.3** – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* em arroz cozido, inoculado com conídios provenientes de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após 15 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 29,04\%$); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro. 88
- Figura 5.4** – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*); letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), para mortalidade total ($CV = 18,52\%$) e confirmada ($CV = 22,89\%$). As mortalidades nas testemunhas, total (7,33%) e confirmada (0%), diferem dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro. 89
- Figura 5.5** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), não expostos e expostos a 30°C por 15 dias. Interação não significativa para os conídios não expostos; e para os expostos a 30°C, as letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 14,73\%$); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro..... 92
- Figura 5.6** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após

exposição à radiação ultravioleta por um minuto. Interação entre cultivos sucessivos e os meios não significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); CV: 18,37 e 26,36% para não expostos e expostos a radiação UV, respectivamente; (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro. 94

- Figura 6.1** – Crescimento vegetativo (cm^2) *in vitro* de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após dez dias de incubação; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=9,50%). 108
- Figura 6.2** – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios colônia^{-1}) *in vitro* de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após dez dias de incubação; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=19,61%). 109
- Figura 6.3** – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* ($\times 10^7$ conídios g^{-1}) em arroz cozido, inoculado com conídios provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após 15 dias de incubação; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=18,44%); 111
- Figura 6.4** – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por conídios de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por insetos da mesma espécie; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para mortalidade total (CV=14,98%) e confirmada (CV=16,61%). As mortalidades nas testemunhas total (3,60%) e confirmada (0%) diferem dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); 112

- Figura 6.5** – Viabilidade de conídios (germinação %) de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após armazenagem a 30°C por 15 dias; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para conídios não expostos (CV=2,58%) e expostos a 30°C (CV=9,13%). 114
- Figura 6.6** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após exposição à radiação ultravioleta por um minuto; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), para conídios não expostos (CV=6,48%) e expostos à radiação UV (13,93%). 116

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1** – Composição dos meios de cultivo para produção de conídios de *Beauveria bassiana*..... 44
- Tabela 4.2** – Composição química de conídios de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzidos em diferentes meios de cultivos e em insetos. 68
- Tabela 4.3** – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis produção de conídios (14 dias), tolerância à radiação UV (3 mim. de exposição), tolerância à temperatura (20 dias de exposição), virulência (mortalidade confirmada) e teor endógeno dos elementos químicos nos conídios de *Beauveria bassiana*..... 71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO GERAL	18
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	USO DOS AGROTÓXICOS.....	19
3.2	CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS	20
3.3	FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	21
3.4	FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	23
3.4.1	Produção de Fungos	24
3.4.2	Cultivos Sucessivos <i>in vitro</i>	27
3.4.3	Passagens Sucessivas pelo Hospedeiro	28
3.4.4	Temperatura.....	30
3.4.5	Radiação Ultravioleta.....	31
	REFERÊNCIAS	33
4	ARTIGO A: MEIOS DE CULTIVO PARA <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL. E INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES NUTRICIONAIS NA QUALIDADE DOS CONÍDIOS	40
	Resumo	40
	Abstract.....	40
4.1	INTRODUÇÃO	41
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.4	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	72

5	ARTIGO B: EFEITO DE CULTIVOS SUCESSIVOS <i>IN VITRO</i> DE <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL. NA QUALIDADE DOS CONÍDIOS	78
	Resumo	78
	Abstract	78
5.1	INTRODUÇÃO	79
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	80
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.4	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
6	ARTIGO C: EFEITO DE PASSAGENS SUCESSIVAS DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> (BALS.) VUILL. PELO HOSPEDEIRO NA QUALIDADE DOS CONÍDIOS	101
	Resumo	101
	Abstract	101
6.1	INTRODUÇÃO	102
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	103
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
6.4	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS	117
7	CONCLUSÕES GERAIS	122

1 INTRODUÇÃO

O Brasil assumiu, no ano de 2008, o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo e, de acordo com um estudo realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 29% de amostras de alimentos analisadas no país apresentaram irregularidades, como a presença de agrotóxicos em níveis acima do limite máximo de resíduos e/ou resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura (ANVISA, 2010). Esses dados alertam para o uso excessivo e indiscriminado dos agrotóxicos, que provocam a contaminação dos solos, da atmosfera, das águas, dos alimentos, traz efeitos negativos aos organismos terrestres e aquáticos, além da intoxicação humana (SPADOTTO, 2006). Para minimizar esses e outros efeitos, o manejo integrado de pragas (MIP) é a principal estratégia e tem como base o controle biológico e o uso de práticas culturais adequadas (PEREIRA et al., 1998).

Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle biológico, entretanto alguns fatores limitam o aumento seu uso em várias culturas. Um deles é a sua ação mais lenta quando comparado aos inseticidas químicos. Além disso, exigem condições ambientais favoráveis para que sejam eficientes, pois a atividade fúngica é fortemente influenciada pelas condições bióticas e abióticas (PELL et al., 2001). A composição do meio de cultivo também tem estreita relação com o custo e a qualidade do fungo, pois pode influenciar o tipo, a quantidade, a estabilidade após secagem e a virulência (LEITE et al., 2003). Safavi et al. (2007) observaram que o meio responsável pelo baixo crescimento vegetativo e esporulação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. deu origem a conídios menos virulêntos. Outros estudos relacionam a menor virulência a conídios produzidos em meios nutricionalmente ricos (KAMP; BIDOCHKA, 2002; RANGEL et al., 2008).

A estabilidade da virulência e a alta esporulação são importantes para o desenvolvimento de produtos à base de fungos (VANDENBERG; CATONE, 2004). Entretanto, após cultivos sucessivos *in vitro* podem ocorrer alterações na morfologia e na virulência de fungos (MORROW et al., 1989; SHAH et al., 2007). Butt e Copping (2000) ressaltam que é necessário identificar condições de cultivo que retenham a virulência, sem aumentar os custos, no entanto, pouco progresso tem sido feito nesta área, pois os mecanismos de atenuação da virulência ainda não foram elucidados. Feng et al. (1994) acreditam que estas alterações possam ser consequência de mudanças genéticas e que, talvez, possam ser minimizadas pela passagem rotineira do isolado pelo hospedeiro ou pela utilização

de isolamentos monospóricos. A passagem sucessiva do fungo pelo hospedeiro pode restabelecer a virulência e em alguns casos, promover seu incremento (DAOUST; ROBERTS, 1982). A diversidade genética de uma população do patógeno pode ser alterada após passagens pelo hospedeiro. Isso foi comprovado para *Aspergillus flavus* (Link) que, após passagens sucessivas por *Galleria mellonella* (Linn.) (Lepidoptera: Galleriidae), teve redução da sua variabilidade genética (SCULLY; BIDOCHKA, 2006).

A eficácia dos fungos é extremamente dependente das condições ambientais, sendo a temperatura e a radiação UV as mais limitantes. A temperatura afeta seu metabolismo, a produção de enzimas e toxinas, a germinação, a penetração, a colonização e a reprodução (ALVES; LECOUNA, 1998). A radiação UV pode causar danos as macromoléculas celulares, como o DNA, as proteínas, as biomembranas, ao RNA e aos ribossomos (ENGELBERG et al., 1994; GRIFFITHS et al., 1998). O calor associado à radiação UV danifica os conídios e contribui para falhas em programas de controle biológico (RANGEL et al., 2005).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos das condições nutricionais de cultivos, de cultivos sucessivos *in vitro* e de passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro, sobre a produção de conídios, virulência e tolerância à temperatura e à radiação UV, para *B. bassiana*

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das condições nutricionais de cultivos, de cultivos sucessivos *in vitro* e de passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro, sobre parâmetros biológicos de *B. bassiana*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver meios para a produção *in vitro* de conídios;
- Aumentar a produção de conídios em arroz pela adição de soluções nutritivas na calda de cozimento dos grãos;
- Avaliar a eficiência do fungo produzido em diferentes condições nutricionais em relação à virulência e tolerância à temperatura e à radiação UV;
- Correlacionar a composição química dos conídios produzidos em diferentes condições nutricionais com a produção de conídios, a virulência e tolerância à temperatura e à radiação UV;
- Avaliar os efeitos de cultivos sucessivos *in vitro*, em diferentes meios, em relação à produção de conídios, ao crescimento vegetativo, à virulência e à tolerância à temperatura e à radiação UV;
- Avaliar os efeitos de passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro em relação à produção de conídios, ao crescimento vegetativo, à virulência e à tolerância à temperatura e à radiação UV;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 USO DOS AGROTÓXICOS

A simplificação dos agroecossistemas pelas monoculturas e a expansão das áreas cultivadas contribuem para o aumento do uso de agrotóxicos em todo o mundo. Esse sistema de produção tem como consequência o desequilíbrio ecológico, que favorece o aumento de pragas que causam sérios prejuízos às espécies cultivadas. Estima-se que, das espécies de insetos conhecidas, cerca de 10% sejam consideradas pragas da agricultura ou pragas urbanas (ALVES, 1998a).

Em 2008, o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos. Do total comercializado no país, os inseticidas correspondem a 30%, sendo o segundo maior montante, com 90.562 toneladas, das quais 84% estão inseridas nas Classes I (Produto Altamente Perigoso) e II (Muito Perigoso) (REBELO et al., 2010). Um estudo referente ao monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), constatou que, das 3130 amostras analisadas em todo território nacional, 29% apresentaram irregularidades, como a presença de agrotóxicos em níveis acima do limite máximo de resíduos e/ou continham resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura (ANVISA, 2010). Esses dados alertam para o uso excessivo e indiscriminado dos agrotóxicos, que provocam a contaminação dos solos, da atmosfera, das águas, dos alimentos; promovendo efeitos negativos aos organismos terrestres e aquáticos, intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, assim como o risco de intoxicação dos trabalhadores rurais (SPADOTTO, 2006).

A maioria dos inseticidas apresenta amplo espectro de ação, o que afeta, direta ou indiretamente, os organismos que atuam em diferentes níveis tróficos, incluindo a microbiota e outros organismos do solo. Isto provoca uma alteração nas interações entre as espécies e rompimento das cadeias tróficas, impossibilitando o controle biológico natural (BARBOSA, 1998). Para minimizar esses e outros efeitos causados pelos inseticidas, o manejo integrado de pragas (MIP) é a principal estratégia e se baseia na utilização de táticas que visam o aproveitamento do potencial de controle natural das pragas, evitando o crescimento de populações de pragas a níveis que causem danos econômicos. Desta maneira, a utilização do controle biológico e o uso de práticas culturais adequadas para promovê-lo, formam a base do MIP (PEREIRA et al., 1998).

3.2 CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS

O controle biológico, importante ferramenta do MIP, é uma das alternativas ao uso dos agrotóxicos. Esse método consiste na regulação das populações de pragas por seus inimigos naturais, como predadores, parasitóides e entomopatógenos (fungos, vírus, bactérias, nematóides e protozoários) (GALLO et al., 2002). A utilização dos microrganismos é denominada de Controle Microbiano e tem como ciência a Patologia de Insetos, a qual estuda a etiologia, a sintomatologia e a epizootiologia das doenças, com o objetivo de utilizá-las para o controle de pragas, ou evitá-las em populações de insetos úteis (ALVES, 1998a).

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. foi a espécie que deu origem a teoria microbiana das doenças. Na década de 1830, Agostino Bassi demonstrou, pela primeira vez, que um microrganismo era capaz de causar doença, e que esta podia ser transmitida de um indivíduo doente para outro sadio (FERREIRA; MARTINS, 1997). Tratava-se da “muscardina”, doença que dizimava as populações de bichos-da-seda e teve seus sintomas descritos por Bassi, 1835 apud Ferreira e Martins, 1997:

[...] Morto o animalzinho pelo mal das manchas ou muscardina, pouco depois seu cadáver, que se apresentava antes mole, flácido e cheio de substância líquida, adquire maior consistência; os humores se coagulam, e cada vez se consolida e se endurece, até tornar-se seco, friável e vítreo. [...] a maior parte dos bichos assim mortos tornam-se avermelhados; [...]. Logo depois, os bichos mortos [...] podem então embranquecer-se [...], isto é, cobrir-se de uma pátina ou eflorescência semelhante a flocos puros de neve, quando não falte umidade necessária [...].

Apesar da descoberta de Bassi em 1835, apenas no final da década de 1870 é que o pesquisador russo, Elie Metschnikoff, realizou o primeiro trabalho de controle microbiano utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) para o controle de *Anisoplia austriaca* (Herbst) (Coleoptera: Scarabeidae). Outro fato marcante para a patologia de insetos foi a descoberta da bactéria *Bacillus thuringiensis* por Berliner, em 1911 (ALVES, 1998a).

No Brasil, as primeiras referências sobre a ocorrência de entomopatógenos em pragas e insetos úteis datam da década de 1920, sendo feitas por diversos pesquisadores que trabalhavam com doenças de plantas. Em 1964, a ocorrência epizootica de *M. anisopliae* sobre *Mahanarva posticata* (Stal). (Hemiptera: Cercopidae) no Sudeste brasileiro começou a chamar a atenção de pesquisadores. A importância da área pode ser verificada pelo número de trabalhos publicados, além do incremento no número de projetos e de empresas que produzem e comercializam microrganismos (ALVES et al., 2008a).

A comparação entre o controle microbiano e o químico normalmente é feita na perspectiva da eficiência e do custo. No entanto, são inúmeros seus benefícios em relação à segurança aos seres humanos, organismos não alvos e ao meio ambiente. O controle microbiano possibilita a produção de alimentos sem resíduos químicos e o incremento da biodiversidade e da atividade da maioria dos inimigos naturais. Os microrganismos também apresentam vantagens quando comparados a outros agentes de controle biológico (predadores e parasitóides), pois a maioria pode ser produzida em meios artificiais, ser armazenada e aplicada com equipamentos convencionais. Entre as desvantagens estão a ação mais lenta, a especificidade (espectro de hospedeiros muito amplo ou muito estreito), a baixa persistência e os custos elevados em comparação aos agrotóxicos (LACEY et al., 2001).

Os procedimentos básicos para a utilização de entomopatógenos, assim como para outros agentes de controle biológico, são: introdução, conservação e multiplicação, que representam, respectivamente, o controle biológico clássico, o natural e o aplicado. O primeiro consiste na importação e liberação inoculativa do agente de controle para pragas exóticas, sendo uma medida de controle a longo prazo, pois a população de inimigos naturais tende a aumentar com o passar do tempo. O controle biológico natural refere-se a manipulação do ambiente a fim de criar condições favoráveis a conservação e aumento das populações dos inimigos naturais. Já o controle biológico aplicado trata-se da liberação massal de inimigos naturais após sua produção em larga escala, e visa a redução população da praga para seu nível de equilíbrio (GALLO et al., 2002).

Para a utilização dos entomopatógenos no MIP, ainda é necessário um grande volume de informações visando a integração harmoniosa desses conhecimentos em relação ao agroecossistema, à cultura, às práticas culturais, ao complexo de pragas e aos fatores climáticos que afetam os diferentes componentes do sistema (PEREIRA et al., 1998).

3.3 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano (ALVES, 1998a) e são promissores pela capacidade de supressão de populações de insetos e ácaros, amplo espectro de hospedeiros, possibilidade de cultivo *in vitro* e de serem formulados (LEITE et al., 2003). Aproximadamente 80% das doenças têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes a cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies (ALVES, 1998b). A ocorrência desses patógenos é relativamente comum, sendo um

importante fator de controle de populações de insetos em condições naturais (BUTT et al., 2001).

Atualmente cerca de 12 espécies ou subespécies de fungos têm sido utilizadas como micoinseticidas para aplicações inundativas e inoculativas. Do total dos produtos comercializados a base de fungo, *B. bassiana* (33,9%) e *M. anisopliae* (33,9%) são os mais comuns (FARIA; WRAIGHT, 2007), fato que provavelmente se deve a ampla distribuição geográfica, vasta gama de hospedeiros e a alta variabilidade genética destas espécies (ALVES, 1998b).

Os produtos a base de fungos são utilizados para controle insetos das ordens Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera, Orthoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Siphonaptera e Blattodea. São pelo menos 48 famílias, e destas, os alvos mais comuns são Aleyrodidae, Curculionidae, Cercopidae, Scarabaeidae, Aphididae e Thripidae (FARIA; WRAIGHT, 2007).

No Brasil, são utilizados principalmente *B. bassiana* e *M. anisopliae*, para o controle das cigarrinhas-da-cana-de-açúcar *M. posticata* e *M. fibriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae), cigarrinhas-da-pastagem pertencentes aos gêneros *Mahanarva*, *Deois* e *Zulia* (Hemiptera: Cercopidae), cupim de montículo em pastagem do gênero *Cornitermes* (Isoptera: Termitidae), gafanhotos *Schistocerca pallens* (Thrunberg) (Orthoptera: Acrididae), *Stiphra robusta* (Mello-Leitão) (Orthoptera: Proscopiidae), *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn) (Orthoptera: Acrididae), moleque-da-bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae), percevejo-de-renda em seringueira *Leptopharsa haveae* (Drake e Poor) (Heteroptera: Tingidae), broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) e pragas de cultivos protegidos como *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae), *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) e *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: aleyrodidae) (ALVES et al., 2008b).

A variabilidade genética desses entomopatógenos possibilita selecionar isolados altamente virulentos para um vasto espectro de hospedeiros. Os fungos podem também infectar diferentes estágios de desenvolvimento, como ovos, larvas, pupas e adultos. A maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem a outros patógenos que entram no inseto por via oral (ALVES, 1998b). O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como das condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. O ciclo apresenta as seguintes fases: adesão, germinação, formação dos

apressórios, penetração, colonização, reprodução do patógeno e disseminação, para o início de um novo ciclo (ALVES, 1998b).

O gênero *Beauveria* é parasito de muitos artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros (ALVES, 1998b). Além de ser o primeiro microrganismo identificado como patogênico a insetos (FERREIRA; MARTINS, 1997), é um dos mais pesquisados, o que se deve em parte por ser menos exigente nutricionalmente, podendo ser cultivado facilmente em meios de cultivo (LEITE et al., 2003). *B. bassiana* é mais frequente em insetos e amostras de solo, com ocorrência generalizada em todos os países (ALVES, 1998b). Mais de 200 espécies de insetos pertencentes a nove ordens, principalmente Lepidoptera e Coleoptera, foram registradas como hospedeiras de *B. bassiana* (LI, 1988 apud FENG et al., 1994). Apesar desta ampla gama de hospedeiros, não é frequente a ocorrência natural de epizootias desse patógeno (FENG et al., 1994).

B. bassiana produz pelo menos três estruturas infecciosas, que são os conídios aéreos, os blastosporos e os conídios submersos. Estas estruturas apresentam diferentes propriedades morfológicas e bioquímicas (CHO et al., 2006). Os conídios aéreos são relativamente mais resistentes às condições ambientais e são as estruturas mais utilizadas no controle biológico (HOLDER; KEYHANI, 2005). Compostos antimicrobianos, como a lizozina e peptídeos antimicrobianos, foram identificados em *B. bassiana* como defesa contra a microflora endógena do hospedeiro ou colonizadores secundários (CHO et al., 2006). O processo de infecção do hospedeiro ocorre normalmente via tegumento, onde o fungo germina em 12 a 18 h. A penetração acontece por meio de uma ação mecânica e química (enzimática), que leva aproximadamente 12 h. Decorridas 72 h da inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado. A morte ocorre em função da falta de nutrientes e do acúmulo de substâncias tóxicas. Sobre o cadáver ocorre a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios, dando início a um novo ciclo (ALVES, 1998b).

3.4 FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Alguns fatores têm limitado o aumento do uso de fungos no controle microbiano em várias culturas. Um dos problemas para sua aceitação é a ação mais lenta quando comparado aos inseticidas químicos. Também é necessário que haja condições ambientais favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade para que sejam eficientes, pois a atividade fúngica é fortemente influenciada pelas condições bióticas e abióticas (PELL et al., 2001). Normalmente, os fungos apresentam um bom desempenho no laboratório, mas a

maioria é menos eficaz no campo. Por esse motivo, esses patógenos devem ser "preparados" para condições de campo, a fim de tolerar uma ampla variação das condições climáticas (temperaturas oscilantes, umidade, luz ultravioleta), edáficas (tipos de solo) e fatores bióticos (organismos antagonistas). A adaptação ecológica dos isolados pode ser melhorada por meio da manipulação fisiológica das reservas endógenas e utilização de formulações adequadas (BUTT; COPPING, 2000).

3.4.1 Produção de Fungos

A grande maioria dos programas de controle microbiano com fungos na América Latina utiliza as estratégias de incremento e introdução inundativa, nas quais o patógeno é aplicado em concentrações relativamente elevadas, na forma de um produto microbiano (micoinseticidas). A produção em larga escala é normalmente feita por processos fermentativos em meios líquidos, sólidos, semi-sólidos ou pelo processo bifásico, que é a associação de meios líquidos e sólidos (ALVES et al., 2008c). Para os fungos que produzem conídios aéreos, como *M. anisopliae* e *B. bassiana*, a fermentação sólida é a mais adequada e utiliza o arroz cozido como substrato. Normalmente, são vendidos na formulação em grânulos, constituída do fungo mais o substrato (fungo + arroz), e também na forma de pó, resultante da moagem do substrato mais o fungo (ALVES et al., 2008c).

O crescimento dos fungos está relacionado a uma série de influências, como a dos nutrientes, da temperatura, da umidade e da luz. Quando são cultivados em meios sintéticos, constata-se que as diferentes quantidades de nutrientes têm um efeito notável sobre a forma e a atividade reprodutiva do fungo (SILVEIRA, 1995). Os fungos são organismos heterotróficos que exigem uma fonte orgânica de C, utilizada como material plástico ou energético e uma fonte de N, que pode ser inorgânica ou orgânica. Também são essenciais elementos como Ca, H, C, N, O, P, S, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu e Mb. Íons, como o Fe, Cu e Mn, em baixos níveis, podem agir como catalisadores do crescimento, porém, em excesso, tornam-se prejudiciais aos fungos (LACAZ et al., 1970).

Os primeiros estudos para o desenvolvimento de meios sintético foram realizados por Pasteur em 1859, que conseguiu multiplicar o fungo *Sacharomyces cerevisiae* em um meio líquido, que mais tarde chamou-se Líquido de Pasteur, composto por água pura, açúcar cande e tartarato de amônio. Continuando os trabalhos de Pasteur, Raulin experimentou vários meios líquidos em que manipulou H, O, N, C, S, K, Si, P, Mg, Z e Fe, e finalmente formulou o meio clássico conhecido com seu nome, com a seguinte composição:

água, açúcar cande, ácido tartárico, nitrato de amônio, fosfato de amônio, carbonato de potássio, carbonato de magnésio, sulfato de amônio, sulfato de zinco, sulfato de ferro e silicato de potássio (SILVEIRA, 1995). Os meios de cultivo podem ter a composição bem determinada, como os sintéticos, ou mal definidas, como os meios chamados complexos, como arroz, trigo e outros (ALVES et al., 1998).

Entre os estudos sobre a nutrição dos fungos entomopatogênicos, a grande maioria avalia os efeitos da relação C:N da composição dos meios de cultivo sobre o crescimento vegetativo, esporulação e viabilidade (SAFAVI et al., 2007). Segundo Carlile e Watkinson (1994), um meio balanceado deverá conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio. O primeiro é necessário como fonte de energia, enquanto o segundo é essencial na síntese dos componentes celulares, tais como ácidos nucleicos e quitina. Já o fósforo é necessário na síntese de ácidos nucleicos e ATP. Além da relação C:N, a diversidade de fontes desses elementos tem sido explorada no desenvolvimento de meios de cultivo, especialmente dos meios complexos a base de produtos naturais (LEITE et al., 2003).

A composição do meio de cultivo tem estreita relação com o custo e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, formato, quantidade do propágulo produzido, além de sua estabilidade após secagem e sua agressividade (LEITE et al., 2003). Francisco et al. (2006) observaram que o meio de cultivo influencia a germinação de conídios de *B. bassiana*, que foi favorecida por meios nutricionalmente mais ricos como BDA, BDA acrescido de 1% de extrato de levedura, SDAY (sabouraud, dextrose, ágar, extrato de levedura) (ALVES et al., 1998) e MC (meio completo) (PONTECORVO et al., 1953 modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973). Enquanto que os meios ágar-água e Meio Mínimo (PONTECORVO et al., 1953), que são nutricionalmente mais pobres, promoveram uma menor porcentagem de germinação. Resultados semelhantes foram observados para os isolados das espécies *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) e *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise). Entretanto, alguns isolados apresentaram boa germinação também nos meios com menor quantidade de nutrientes. Os autores acreditam que para nesses isolados existe uma boa reserva endógena de nutrientes.

O meio de cultivo que favorece o crescimento micelial não necessariamente favorecerá a esporulação, que é estimulada em meios mais pobres (KAMP; BIDOCHKA, 2002). Para *B. bassiana*, Campbell et al. (1978) sugerem que uma maior esporulação em condições onde a fonte de nitrogênio seja pouco satisfatória ao crescimento é uma resposta à sobrevivência. Para Li e Holdom (1995), uma fonte de nitrogênio e de carboidrato são necessárias para o desenvolvimento micelial de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Verticillium*

lecanii (Zimmerman), sendo a inanição necessária para estimular a formação de conídios. Porém, se as condições nutricionais do meio forem muito limitantes não irá ocorrer um crescimento micelial satisfatório (KAMP; BIDOCHKA, 2002), o que conseqüentemente acarretará em uma menor produção de conídios.

A condição nutricional do meio de cultivo para a produção de fungos entomopatogênicos, além da estreita relação com a viabilidade e esporulação, apresenta grande influência na virulência. Safavi et al. (2007) observaram que o meio de cultivo responsável pelo baixo crescimento vegetativo e esporulação de *B. bassiana* deu origem a conídios com maior taxa de germinação e menor tempo letal para larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae).

Para conídios de *Hirsuella thompsonii* (Fischer) produzidos em diferentes meios, Rossi-Zalaf et al. (2008) verificaram uma correlação entre a maior viabilidade dos conídios e a virulência a *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). Alguns trabalhos mostram que meios ricos em nutrientes geralmente dão origem a conídios com menor virulência, comparados aqueles produzidos em meios mais pobres (JABOR et al., 2003; KAMP; BIDOCHKA, 2002; RANGEL et al., 2008).

A produção de proteases pelos fungos entomopatogênicos também é influenciada pelo meio de cultivo. Safavi et al. (2007) observaram variação na atividade da enzima Pr1 para os isolados de *B. bassiana* produzidos em diferentes meios de cultivo. No entanto, não houve correlação entre a atividade enzimática e a virulência do fungo às larvas de *T. molitor*. Para diferentes isolados de *M. anisopliae*, Tiago e Silva (2007) verificaram que a atividade proteolítica e a produção de proteases extracelulares foram menores em meio de cultivo acrescido de cutícula de *Deois flavopicta* (Stal) (Homoptera: Cercopidae) e *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). Uma das proteases mais estudadas em *M. anisopliae* é a Pr1, que é reprimida na presença de excesso de nutrientes e induzida em condições nutricionalmente pobres (SHAH et al., 2005; WANG et al., 2002).

São poucos os trabalhos que avaliam a influência do meio de cultivo sobre a composição química dos conídios produzidos, e os que existem avaliam apenas a relação C:N endógena. Safavi et al. (2007) verificaram que conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, produzidos em meios com diferentes relações C:N, apresentavam diferenças em sua composição, sendo a maior relação C:N observada em conídios provenientes do meio que também continham uma maior relação dos elementos. Não foi possível estabelecer nenhuma associação entre a relação C:N dos conídios e o crescimento vegetativo, esporulação, produção de proteases, viabilidade e virulência. Shah et al. (2005) observaram que dois

isolados de *M. anisopliae* apresentaram respostas semelhantes na relação C:N da composição dos seus conídios produzidos em diferentes meios. Esses autores também não observaram correlação entre a composição dos conídios e a virulência.

3.4.2 Cultivos Sucessivos *in vitro*

A estabilidade de características como a virulência e a esporulação são fundamentais para o desenvolvimento de produtos comerciais à base de fungos (VANDENBERG; CATONE, 2004). Alguns estudos mostraram que podem ocorrer alterações na morfologia e na virulência de fungos após cultivos sucessivos *in vitro* (BARBOSA et al., 1985; MORROW et al., 1989; SHAH et al., 2007). Por isso, após a seleção de um isolado de fungo para o controle de uma determinada praga, é imprescindível verificar rotineiramente se as características de virulência e esporulação são preservadas durante o processo de produção em larga escala, onde o patógeno é cultivado por vários e sucessivos ciclos em meio de cultivo.

Butt e Copping (2000) ressaltam que é necessário identificar condições de cultivo que retenham a virulência, sem aumentar os custos de produção. No entanto, pouco progresso tem sido feito nesta área, em parte porque os mecanismos de atenuação da virulência não foram elucidados. Feng et al. (1994) acreditam que para *B. bassiana* estas alterações possam ser consequência de mudanças genéticas devido a um ciclo parassexual, como relatado por Paccola-Meirelles e Azevedo (1991), e talvez possa ser minimizada pela passagem rotineira do isolado pelo hospedeiro ou pela utilização de isolamentos monospóricos. Os meios naturais complexos podem evitar a seleção de mutantes nutricionais menos patogênicos, muito comum quando se utilizam meios artificiais (MARSHALL, 1915 apud PEREIRA; EIRA, 1999).

Existe uma variação muito grande quanto aos resultados obtidos em diferentes trabalhos que avaliaram o efeito de cultivos sucessivos *in vitro* em relação à manutenção da virulência e outras características. Alterações fenotípicas e perda de virulência de *Nomuraea rileyi* (Farlow) a *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) foram observadas após 10 cultivos sucessivos *in vitro* (MORROW et al., 1989). Por outro lado, passagens *in vitro* por até 98 vezes não afetaram a virulência de *V. lecanni* a *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette) (Hemiptera: Aphididae), porém ocorreram alterações morfológicas e redução do crescimento das colônias (HALL, 1980).

Barbosa et al. (1985) observaram redução da virulência de *M. anisopliae* a *D. flavopicta* após o cultivo sucessivo em arroz. A virulência de dois isolados de *M. anisopliae* a *T. molitor*, avaliada pelo tempo letal, apresentou redução após cultivos sucessivos em meio sintético, sendo mais acentuada a partir do 9º cultivo. Esses cultivos também influenciaram na produção da protease Pr1, que foi reduzida a partir do 3º e 5º cultivo para os isolados V 275 e V245, respectivamente (SHAH et al., 2007).

Brownbridge et al. (2001) não observaram alterações morfológicas e redução da virulência de um isolado de *B. bassiana* a *B. argentifolli* (Bellows e Perring) (Homoptera: Aleyrodidae) após 15 passagens sucessivas em meio SDY, concluindo que esse isolado apresenta características estáveis para a produção massal. A passagem *in vitro* de *P. fumosoroseus*, por 30 repicagens no mesmo meio, não afetou a virulência a *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Hemiptera: Aphididae) e *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae), entretanto, para alguns dos isolados foi observado redução na produção de micélio em meio líquido, produção de esporos em meio sólido e viabilidade dos conídios (VANDENBERG; CATONE, 2004).

Os resultados divergentes obtidos nos estudos sobre a virulência de fungos após sucessivas repicagens em meio de cultivo podem estar relacionados às variações inter e intraespecífica, às diferenças metodológicas, como a utilização de conídios de origem monospórica ou multispórica, uso de meios de cultivo enriquecidos, mutações e condições de cultivo (BROWNBRIDGE et al., 2001).

3.4.3 Passagens Sucessivas Pelo Hospedeiro

A virulência é a principal característica de um fungo entomopatogênico, devendo-se manuseá-lo adequadamente para mantê-la ou melhorá-la por meio de métodos genéticos, físicos, químicos ou biológicos, e dentre esses, recomenda-se passagens sucessivas em insetos alvo (ALVES; PEREIRA, 1998; AZEVEDO, 1998; SERAFINI et al., 2001). Alguns trabalhos mostram que passagens dos fungos pelos seus hospedeiros podem alterar, além da virulência, as características morfológicas, a viabilidade, a esporulação e a composição química endógena dos conídios.

O restabelecimento e, para alguns isolados, o aumento da virulência de *M. anisopliae* foi observado por Daoust e Roberts (1982), após a passagem do fungo por larvas de *Culex pipiens* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). Para os isolados que apresentaram aumento da virulência, esta permaneceu estável, mesmo após alguns cultivos em meios de cultivo.

Após a passagem do isolado 4461 de *P. fumoroseus* pelo hospedeiro *D. noxia* por 15 vezes consecutivas, não foi observada alteração na virulência para *D. noxia* e para *P. xylostella*. No entanto, após a passagem do fungo por 15 vezes em *P. xylostella*, houve redução na virulência para *D. noxia*. Esta redução não foi recuperada, mesmo após cinco novas passagens do fungo por *D. noxia*. Já para o isolado 4491 houve a recuperação da virulência após as cinco passagens em *D. noxia* (VANDENBERG; CANTONE, 2004). De acordo com Ferron (1985), isolados de fungos Hyphomycetes podem adaptar-se a determinados hospedeiros após passagens forçadas por uma determinada espécie.

Para *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) verificou-se que, passagens sucessivas de *M. anisopliae* pelo hospedeiro promoveram um aumento da virulência a partir da 4ª passagem, sendo mais pronunciado na 7ª. As passagens do fungo pelo hospedeiro também influenciaram na taxa de oviposição das fêmeas sobreviventes, que foi menor na 7ª passagem (ADAMES et al., 2010). Além do aumento da virulência de *B. bassiana* a *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Orthoptera: Acrididae), Quesada-Moraga e Vey (2003) observaram que o fungo produziu uma maior quantidade de macromoléculas tóxicas após duas passagens pelo hospedeiro.

A virulência do fungo ao inseto pode estar relacionada, entre outras causas, com a produção de proteases e com a capacidade de adesão dos conídios a cutícula. Para alguns isolados de *B. bassiana*, a virulência a *Nilaparvata lugens* (Stal) (Homoptera: Delphacidae) aumentou após três passagens do fungo pelo hospedeiro. Esse aumento pode ser explicado pelo significativo acréscimo da atividade da protease Pr1, da hidrofobicidade e potencial zeta dos conídios, sendo as duas últimas características correlacionadas com a capacidade de adesão (SONG; FENG, 2011).

A variação genética de uma população do patógeno pode ser alterada após passagens pelo hospedeiro. Isso foi comprovado para um isolado de *Aspergillus flavus* (Lik) que, após passagens sucessivas por *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae), teve redução da sua diversidade genética. O hospedeiro serviu como um gargalo genético, fato que apresenta implicações importantes para o entendimento de patógenos responsáveis por doenças microbianas em humanos, como as infecções hospitalares (SCULLY; BIDOCHKA, 2006). A composição química dos conídios também pode variar após a passagem do fungo pelo hospedeiro, como observado para *B. bassiana* após passagem por *T. molitor* que apresentou redução endógena da relação C:N dos conídios (SAFAVI et al., 2007).

3.4.4 Temperatura

A eficácia dos fungos entomopatogênicos no campo é extremamente dependente das condições ambientais (ZIMMERMANN, 1982), sendo a temperatura uma das mais importantes, pois afeta o metabolismo dos fungos, alterando os processos de produção de enzimas, toxinas, germinação dos esporos, desenvolvimento do tubo germinativo, penetração, colonização e reprodução. As exigências térmicas dos fungos são variáveis em função da espécie, raça e fase de desenvolvimento (ALVES; LECUONA, 1998).

A maioria dos fungos entomopatogênicos é considerada mesofílica por desenvolverem-se entre as temperaturas de 10 e 40°C, e considerarem como ótimas as temperaturas entre 25 e 35°C (COONEY; EMERSON, 1964). *B. bassiana* desenvolve-se em uma amplitude considerável de temperaturas que varia de 8 a 35 °C. Seu limite térmico mínimo é de 8°C e máximo de 37°C. No entanto, as respostas de crescimento podem variar consideravelmente entre os isolados, o que justifica, durante a seleção de um isolado para o controle microbiano, a avaliação das exigências térmicas (FARGUES et al., 1997).

No solo, a temperatura e umidade ideal para a persistência de alguns fungos entomopatogênicos pode variar de acordo com a linhagem. As condições de baixa ou média temperatura e umidade do solo favorecem a sobrevivência dos conídios, enquanto alta temperatura e umidade elevada podem reduzi-la (KESSLER et al., 2003; STUDDERT; KAYA, 1990). Além disso, as altas temperaturas também podem retardar o processo de germinação dos conídios de algumas espécies de fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana* e de *M. anisopliae* (DEVI et al., 2005; RANGEL et al., 2005). Uma variabilidade em termotolerância foi encontrada para isolados de *M. anisopliae* obtidos de latitudes entre 61°N e 54°S. A maioria deles apresentou germinação maior que 90% após 12 h de exposição a 40°C. Após oito e 12 h de exposição a 45°C, apenas dois isolados apresentaram elevada taxa de germinação e foram virulêntos a gafanhotos. Em geral, isolados coletados em maiores latitudes demonstraram maior susceptibilidade ao calor do que isolados originados próximos à linha do equador (RANGEL et al., 2005).

A variabilidade genética é importante para a adaptação dos fungos entomopatogênicos às diferentes regiões climáticas, o que possibilita para espécies como *B. bassiana* serem encontradas no mundo inteiro. A ampla variação na tolerância ao calor proporciona a esta espécie notável adaptação a condições de grande flutuação térmica (FARGUES et al., 1997). Isolados de *M. anisopliae* obtidos de regiões agrícolas foram mais tolerantes à exposição ao calor e à radiação ultravioleta, do que os obtidos em regiões de

floresta com latitudes semelhantes (BIDOCHKA et al., 2001). Rangel et al. (2005) verificaram que isolados de *M. anisopliae* obtidos de maiores latitudes demonstraram maior sensibilidade ao calor do que os isolados obtidos próximos ao equador.

A temperatura afeta a persistência dos conídios e a mortalidade de insetos subterrâneos expostos a fungos (RATH, 2002). Lanza et al. (2009) observaram redução na sobrevivência de *M. anisopliae* inoculado em solo e mantido a $31,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com declínio acentuado após 100 dias. Lingg e Donaldson (1981) constataram uma maior persistência de conídios de *B. bassiana* em temperaturas mais baixas (17 e 24°C) do que em altas (30°C). Para conídios puros de *B. bassiana*, Marques e Alves (1996) verificaram que quando mantidos a 20°C durante 180 dias praticamente não mostraram redução da viabilidade.

A exposição ao calor por condução no solo ou por radiação direta é um dos fatores de estresse mais importantes na utilização de fungos entomopatogênicos no campo. Além disso, o calor, associado com a radiação ultravioleta, danifica o conídio e contribui para falhas em programas de controle biológico de insetos (RANGEL et al., 2005). A fim de avaliar a habilidade de um isolado de fungo para o controle de uma população de artrópodes, não se deve considerar apenas a sua virulência, mas também sua capacidade de adequação ao ambiente do hospedeiro alvo (SMITS et al., 2003).

3.4.5 Radiação Ultravioleta

A radiação solar que chega até a Terra diariamente contém uma faixa de ultravioleta (UV), uma faixa de luz visível e uma outra de infravermelho. Destas, a faixa UV representa o principal agente de inibição dos entomopatógenos (ALVES; LECUONA, 1998), e entre os fatores abióticos, é o mais importante (BRAGA et al., 2001a, CAGAN; SVERCEL, 2001). Isso ocorre porque a exposição à radiação pode causar danos às macromoléculas, como o DNA, as proteínas, as biomembranas, ao RNA e aos ribossomos (ENGELBERG et al., 1994; GRIFFITHS et al., 1998).

Para os conídios que sobrevivem após a exposição à radiação UV, Braga et al. (2001b) verificaram que ocorre um atraso da germinação. A exposição dos fungos por tempos sub-letais à radiação UV pode causar mudanças genéticas e/ou fisiológicas que prejudicam a germinação e o crescimento, reduzindo a eficiência do controle biológico (BRAGA et al., 2002; MORLEY-DAVIES et al., 1995).

A tolerância à radiação UV é variável entre as espécies de fungos entomopatogênicos. O principal mecanismo de resistência se refere à existência de

ferramentas de reparo de DNA que promovem a recuperação dos danos causados pelo estresse oxidativo do material genético, decorrentes da exposição à radiação UV (CHELICO; KHACHATOURIANS, 2007). Alguns trabalhos mostram uma associação entre o grau de resistência à radiação e a origem geográfica dos isolados, sendo que os oriundos de menores latitudes apresentaram menor suscetibilidade à exposição (LELAND et al., 2005; FERNANDES et al., 2007). Para diferentes espécies e isolados de *Metarhizium*, expostos por uma e duas horas à radiação UV, observou-se que quanto maior a latitude de origem dos isolados, menor foi a tolerância à radiação. Algumas espécies apresentaram um atraso na germinação, que foi proporcional ao tempo de exposição e, aparentemente, sem relação com o nível de tolerância apresentado pelo isolado (BRAGA et al., 2001a).

O atraso na germinação e a inativação dos conídios pela radiação UV limitam o uso dos fungos entomopatogênicos no controle microbiano. A redução desses danos pode se dar pela seleção de isolados mais tolerantes à radiação e pela incorporação de substâncias protetoras aos raios ultravioletas nas formulações, o que pode prolongar significativamente a persistência desses fungos em ambientes onde ficam expostos a luz solar (FARGUES et al., 1996).

Outro fator que pode influenciar a tolerância a radiação UV é a nutrição disponibilizada ao fungo durante seu cultivo. O estresse nutricional pode levar a produção de conídios com maior resistência a UV em um fenômeno conhecido como proteção cruzada (RANGEL et al., 2008). Rangel et al. 2004 observaram que conídios de *M. anisopliae* produzidos sobre insetos foram menos tolerantes a radiação UV do que aqueles produzidos em meio BDA acrescido de extrato de levedura.

A produção de *M. anisopliae*, em diferentes substratos, deu origem a conídios com níveis distintos de termotolerância à radiação UV após 50 segundos de exposição. O melhor substrato foi a farinha de milho amarela, com 23,67% dos conídios viáveis, seguido do fubá e do arroz parboilizado, com 9,17 e 5,17%, respectivamente (OTTATI-de-LIMA et al., 2010). Esses resultados sugerem que isolados selecionados pela alta virulência podem ser melhorados em relação à termotolerância por meio dos nutrientes que lhes são oferecidos durante o cultivo, a fim promover um controle mais eficiente de insetos nas condições de campo.

REFERÊNCIAS

- ADAMES, M.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; PENÃ-CHORA, G.; HERNÁNDEZ-VELÁSQUEZ, V.M. Effects of passages through a suitable host of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricide-susceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Insect Science**, Madison, v.11, p.1-13, 2010.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998b. p.289-382.
- ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S.B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998a. p.21-38.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 637-712.
- ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.97-170.
- ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATSITA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MARQUES, E.J. Produção de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008c. p.215-238.
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008b. p.69-110.
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; PEREIRA, R.M.; TAMAI, M.A. O controle microbiano na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008a. p.21-48.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.845-870.
- ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). **Anvisa**, Brasília, 2010. 22p.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microorganismos**. Goiânia: UFG, 1998. 490p.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Nacional e Edusp, 1973. 288p.
- BARBOSA, F.R.; MOREIRA, W.A; SANTOS, G. Efeito de sucessivas repicagens em arroz na virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin para *Deois flavopicta*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.20, p.1115-1118, 1985.

- BARBOSA, P. **Conservation Biological Control**. New York: Academic Press, 1998. 396p.
- BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; De CROSS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.1335-1342, 2001.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.78, p.98-108, 2001a.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.74, p.734-739, 2001b.
- BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, New York, v.94, p.912-920, 2002.
- BROWNBIDGE, M.; COSTA, S.; JARONSKI, S.T. Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.77, p.280-283, 2001.
- BUTT, T.M.; COPPING, L.G. Fungal biological control agents. **Pesticide outlook**, v.11, p.186-191, 2000.
- BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGN, N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. New York: CAB, 2001. 390p.
- CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, v.2, p.119-125, 2001.
- CAMPBELL, R.K.; PERRING, T.M.; BARNES, G.L.; EIKENBARY, R.D.; GENTRY, C.R. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on media containing various amino acids. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.31, p.289-295, 1978.
- CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. Fungal cells and vegetative growth In: CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. **The Fungi**. London: Academic Press, 1994. p.125-128.
- CHELICO, L.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.98, p.93-100, 2007.

CHO, E.; LIU, L.; FARMERIE, W.; KEYHANI, N.O. EST analysis of DNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, *in vitro* blastospores and submerged conidia. **Microbiology**, New York, v.152, p.2843-2854, 2006.

COONEY, D.G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification**. Londres: W.H Freeman, 1964. 188p.

DAOUST, R.A.; ROBERSTS, D.W. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.40, p.170-117, 1982.

DEVI, K.U.; SRIDEVI, V.; MOHAN, ChM.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on *in vitro* germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.88, p.181-189, 2005.

ENGELBERG, D.; KLEIN, C.; MARTINETTO, H; STRUHL, K.; KARIN, M. The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. **Cell**, Cambridge, v.77, p.381-390, 1994.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, New York, v.89, p.383-392, 1997.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v.135, p.171-181, 1996.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v.43, p.237-256, 2007.

FENG, M.G.; PROPAWSKI, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol science and technology**, Oxford, v.1, p.3-34, 1994.

FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERT, D.W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.96, p.237-243, 2007.

FERREIRA, R.R.; MARTINS, R.A. Primórdios da moderna teoria dos germes: Agostinho Bassi e a doença dos bichos-da-seda. **Epistème: Filosofia e História das Ciências em Revista**, Porto Alegre, v.3, p.55-71, 1997.

FERRON, P. Fungal control. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.), **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. v.12, p.313-346.

- FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D.A.; CORREIA, A.C.B.; MONTEIRO, A.C. Influência de meios de cultura em teste de viabilidade de fungos entomopatogênicos. **Ciência rural**, Santa Maria, v.36, p.1309-1312, 2006.
- GALLO, D.; KANANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- GRIFFITHS, HR.; MISTRY, P.; HERBERT, K.E.; LUNEC, J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Boca Raton, v.35, p.189-237, 1998.
- HALL, R.A. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.36, p.216-222, 1980.
- HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.71, p.5260-5266, 2005.
- JABOR, I.A.S.; PAMPHILE, J.A.; RODRIGUES, S.B.; MARQUES-SILVA, G.G.; ROCHA, C.L.M.S.C.da. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.25, p.497-501, 2003.
- KAMP, A.M.; BIDOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.74-77, 2002.
- KESSLER, P.; MATZKE, M.H; KELLER, S. The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as biological control agent in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.84, p.15-23, 2003.
- LACAZ, C. da S.; MINAMI, P.S.; PURCHIO, A. **O grande mundo dos fungos**. São Paulo: Editora Polígono/Edusp, 1970. 2255p.
- LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, HK.; VAILS, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? **Biological Control**, Orlando, v.21, p.230-248, 2001.
- LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, p.6-12, 2009.
- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto, 2003. 92p.

LELAND, J.E.; MCGUIRE, M.R.; GRACE, J.A.; JARONSKI, S.T.; ULLOA, M.; PARK, Y.; PLATTNER, R.D. Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.) (Heteroptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v.35, p.104-114, 2005.

LI, D.P.; HOLDOM, D.G. Effects of nutrients on colony formation, growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.65, p.253-260, 1995.

LINGG, A.J.; DONALDSON, M.D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.39, p.191-200, 1981.

MARQUES, E.J.; ALVES, S.B. Otimização de formulações na preservação de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.39, p.861-877, 1996.

MORLEY-DAVIES, J.; MOORE, D.; PRIOR, C. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. **Mycological Research**, Cambridge, v.100, p.31-38, 1995.

MORROW, B.J.; BOUCIAS, D.G.; HEATH, M.A. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* after serial in vitro passage. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.82, p.404-407, 1989.

OTTATI-de-LIMA, E.L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; GASSEN, M.H.; WENZEL, I.M.; ALMEIDA, A.M.B.de; ZAPPELLINI, L.O. Produção semi-sólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, p.651-659, 2010.

PACCOLA-MEIRELES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.57, p.172-176, 1991.

PELL, J.K.; EILENBERG, J.; HAJEK, A.E.; STEINKRAUS, D.C. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CAB International, 2001. p.71-153.

PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; SOSA-GÓMES, D.R.; MACEDO, N. Manejo integrado de pragas. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.1097-1118.

PEREIRA, S.R.de M.; EIRA, A.F.da. Methodology for production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin in submerged cultivation: biomass sporulation, sugar concentration effect and inoculant cost. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, p.389-394, 1999.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v.5, p.141-238, 1953.

QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Intra-specific variation in virulence and *in vitro* production macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of *in vivo* and *in vitro* passage on these factors. **BioControl Science and Technology**, Oxford, v.13, p.323-340, 2003.

RANGEL, D.E.N.; ANDERSON, ANNE J.; ROBERTS, D.W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, Cambridge, v.112, p.1362-1372, 2008.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.88, p.116-125, 2005.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.87, p.77-83, 2004.

RATH, A.C. Ecology of entomopathogenic fungi in field soils. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8. 2002, Foz do Iguacu, PR. **Anais...** Foz do Iguacu: Society for Invertebrate Pathology, p.65-71, 2002.

REBELO, R.M.; VASCONCELOS, R.A.; BUYS, B.D.M.C.; REZENDE, J.A.; MORAES, K.O.C.; OLIVEIRA, R.P. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. **Ibama**, Brasília, 2010. 84 p.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A. Efeito de meios de cultura na virulência de *Hirsutella thompsonii* (Fischer) (Deuteromycetes) para o controle *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, p.312-320, 2008.

SAFAVI, S.A.; SHAH, F.A.; PAKDEL, A.K.; RASOULIAN, G.R.; BANDANI, A.R.; BUTT, T.M. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.270, p.116-123, 2007.

SCULLY, L.R.; BIDOCHKA, M.J. The host acts as a genetic bottleneck during serial infections: an insect-fungal model system. **Current Genetics**, New York, v.50, p.335-345, 2006.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na indústria. In: AZEVEDO, J.L. (Ed.). **O uso dos fungos na biotecnologia**. Guaíba: Agropecuária, p.93-152, 2001.

SHAH, F.A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C.J.; BUTT, T.M. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.276, p.60-66, 2007.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.251, p.259-266, 2005.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Âmbito cultural, 1995. 336p.

SMITS, N.; BRIERE, J.F.; FARGUES, J. Comparison of non- linear temperature-dependent development rate models applied to *in vitro* growth of entomopathogenic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, p.1476-1484, 2003.

SONG, T.-T.; FENG, M.-G. *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.106, p.211-216, 2011.

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, 2006. 9p. Disponível em: <http://fmr.edu.br/npi_2.php>. Acesso em: 15 jan. 2011.

STUDDERT, J.P.; KAYA, H.K. Water potencial, temperature and soil type on theation of *Beauveria bassiana* soil colonies. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.56, p.380-383, 1990.

TIAGO, P.V.; SILVA, R.J.da. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não-cuticulares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.26-30, 2007.

VANDENBERG, J.D.; CANTONE, F.A. Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.85, p.40-45, 2004.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterization of Pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.213, p.251-255, 2002.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.40, p.36-40, 1982.

4 ARTIGO A: MEIOS DE CULTIVO PARA *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. E INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES NUTRICIONAIS NA QUALIDADE DOS CONÍDIOS

Resumo

Os objetivos deste estudo foram desenvolver meios para a produção de *Beauveria bassiana*; aumentar a produtividade de conídios e correlacionar os aspectos nutricionais do cultivo com a virulência, a tolerância à temperatura e à radiação UV. Foram desenvolvidos meios a base de insetos (MAD) e de soluções nutritivas de plantas (SNS e SNH), em diferentes concentrações, que foram comparados a BDA e ao meio para a produção de esporo de *Beauveria* spp (MPE). De modo geral, a produção foi superior em SNS 25%, SNH 25% e MAD 10%. A adição de nutrientes na calda de cozimento do arroz não favorece a produção de conídios para a maioria dos tratamentos. As condições nutricionais afetaram a virulência e a tolerância à temperatura e à radiação UV. Os meios MAD 10%, SNS 25% e SNH 25% favorecem alta produção de conídios, e esta característica varia entre isolados. O meio SNS 25% pode ser considerado um dos melhores, pois, além da alta produção foi mais tolerante à radiação UV. O BDA foi responsável pela menor produção de conídios, os quais foram menos virulentos e tolerantes a UV, porém altamente tolerantes a temperatura. A tolerância à temperatura foi correlacionada positivamente com os teores de K, C e relação C:N endógena nos conídios. O aumento do teor de enxofre influenciou negativamente a produção de conídios, a virulência e a tolerância à UV. O método de análise química de tecido vegetal pode ser utilizado para a caracterização química dos conídios, e os teores dos elementos são influenciados pelo substrato em que o fungo é produzido. Esses resultados mostram que é possível manipular as condições nutricionais de cultivo, a fim de produzir conídios com melhor qualidade.

Palavras-chave: Análise química. *Alphitobius diaperinus*. Controle Biológico. Fatores Abióticos. Fungos Entomopatogênicos. Nutrição de Fungo. Produção de conídios. Radiação UV. Temperatura.

CULTURE MEDIA AND NUTRITIONAL CONDITIONS INFLUENCE ON *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. IN CONIDIAL QUALITY

Abstract

The objectives of this study were to develop a medium to produce *B. bassiana*, increase conidial yield and correlate nutritional subculture aspects to virulence and temperature and UV radiation tolerance. Media were made of insects (MAD) and plant nutrient solutions (SNS and SNH) in different concentrations, that were compared to BDA and to *Beauveria* spp. spores production medium (MPE). Overall, conidial yield was higher in SNS 25%, SNH 25% and MAD 10%. Nutrients addition into cooking rice does not promote conidial yield in most treatments. The nutritional conditions affect the virulence, as well temperature and UV radiation tolerance. The media MAD10%, SNS 25% and SNH 25% gave high conidial yield,

and it varies among isolates. The medium SNS 25% can be considered the best one, because it promote high conidial yield and was more tolerant to UV. The BDA medium promote the lowest conidial yield, conidia that were less virulent and UV tolerant, but tolerant to high temperature. The temperature tolerance was positively correlated with K, C and the endogenous conidia C: N ratio. The conidial production, virulence and UV tolerance decreased when sulfur content increase. The method for chemical analysis of plant tissue is useful to characterize conidia chemical content. These results show that it is possible to manipulate the growing nutritional conditions, to produce conidia with better quality/stability.

Keywords: Abiotic factors. *Alphitobius diaperinus*. Biological control. Chemical Analysis. Entomopathogenic fungi. Nutrition of fungi. Conidial yield. UV radiation. Temperature.

4.1 INTRODUÇÃO

Entre as alternativas ao uso dos inseticidas químicos destaca-se o controle microbiano, no qual, os fungos entomopatogênicos são responsáveis por aproximadamente 80% das doenças que ocorrem em insetos. Isso se deve, principalmente, a capacidade de penetração via tegumento, facilidade de disseminação e ampla variabilidade genética desses patógenos (ALVES, 1998). Mas para que sejam eficientes, independentemente da densidade populacional dos insetos, é necessário que exista um elevado potencial de inóculo na área, o que se consegue por meio de aplicações inundativas no campo (ALVES; PEREIRA, 1998).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. é uma das principais espécies de fungos utilizadas no controle biológico e apresenta a vantagem de poder ser cultivada *in vitro*. Os fungos são organismos heterotróficos que exigem uma fonte orgânica de C, a qual é utilizada como material plástico ou energético, e uma fonte de N que pode ser inorgânica ou orgânica. Também são essenciais elementos como o Ca, H, O, P, S, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu e Mb. Os íons como o Fe, Cu, e Mn, em baixos níveis, podem agir como catalisadores do crescimento, porém, em excesso, tornam-se prejudiciais aos fungos (LACAZ et al., 1970).

Os primeiros estudos quanto ao desenvolvimento de meios sintéticos para o cultivo de microrganismos foram realizados por Pasteur, em 1859, que conseguiu multiplicar *Sacharomyces cerevisiae* em um meio líquido composto por água, açúcar cande e tartarato de amônio. Na continuação de seus trabalhos, Raulin experimentou vários meios líquidos e finalmente formulou o meio clássico conhecido com seu nome, o qual continha água, açúcar cande, ácido tartárico, nitrato de amônio, fosfato de amônio, carbonato de potássio, carbonato de magnésio, sulfato de amônio, sulfato de zinco, sulfato de ferro e silicato de potássio (SILVEIRA, 1995).

Atualmente, a produção em larga escala dos fungos entomopatogênicos é feita por processos fermentativos em meios líquidos, sólidos, semi-sólidos ou pelo processo bifásico, que é a associação de meios líquidos e sólidos (ALVES et al., 2008). A composição do meio de cultivo tem estreita relação com o custo e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, formato, quantidade do propágulo, além de sua estabilidade após secagem e sua agressividade, medida em termos de virulência e patogenicidade (LEITE et al., 2003). Para os fungos que produzem conídios aéreos, como *B. bassiana*, a fermentação sólida é a mais adequada e normalmente utiliza arroz cozido como substrato (ALVES et al., 2008).

No campo, a eficácia dos fungos entomopatogênicos é extremamente dependente das condições ambientais (ZIMMERMANN, 1982), sendo a temperatura e a radiação UV os fatores mais limitantes (ALVES; LECUONA, 1998). Por este motivo, esses patógenos devem ser preparados para condições de campo, a fim de que possam tolerar uma ampla variação das condições climáticas. A adaptação ecológica dos isolados pode ser melhorada por meio da manipulação fisiológica das reservas endógenas e utilização de formulações adequadas (BUTT; COPPING, 2000). A utilização de fungos entomopatogênicos é uma tecnologia que ainda está em desenvolvimento, e melhorias na produção, formulação e aplicação de campo são necessários (POSADA-FLÓREZ, 2008).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver meios de cultivo para a produção de *B. bassiana*; aumentar a produção de conídios em arroz e correlacionar aspectos os nutricionais do cultivo com a virulência, a tolerância à temperatura e à radiação UV.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Isolados, Origem e Multiplicação Inicial do inóculo de *B. bassiana*

Foram utilizados três isolados de *B. bassiana* com diferentes hospedeiros e origem geográfica (Figura 4.1), que fazem parte do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Estadual de Londrina. Antes de serem utilizados nos experimentos, os fungos foram multiplicados em BDA (batata, dextrose, ágar) inoculados em larvas de *Diatraea saccharalis* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae) por submersão em uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ conídios ml^{-1} . Após a morte, os insetos foram desinfetados externamente em solução de hipoclorito de sódio a 2%, lavados em água destilada e acondicionados em câmara úmida. Os conídios produzidos sobre as larvas foram multiplicados em meio BDA, em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotófase 12 h). Após 10 dias

foram removidos do meio e armazenados em tubos Eppendorf a -6°C até o momento da utilização.

Caracterização Molecular dos Isolados de *B. bassiana*

Para verificar diferenças nos perfis genéticos dos isolados, realizou-se a caracterização molecular por RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Para a extração de DNA, cerca de $1,0 \times 10^7$ conídios foram inoculados em 50 ml de Meio Completo Líquido (PONTECORVO et al., 1953). As culturas foram mantidas a 28°C , em 180 rpm por 72 h. A biomassa produzida foi coletada por filtração e lavada com água destilada esterilizada. Os ácidos nucleicos foram extraídos, conforme Azevedo et al. (2000).

As reações de amplificação na análise de RAPD foram realizadas em um volume final de 25 μl , contendo 2,5 μl de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 2,5 μl dNTP (2,5 mM), 2,5 μl primer (Operon Technologies-2,5 mM), 7,5 μl MgCl_2 (10 mM), 0,2 μl Taq DNA polymerase (5 U μl^{-1}), 4,0 μl de DNA (5 ng μl^{-1}) e 5,8 μl de água bidestilada. Após uma desnaturação por 4 min. a 92°C , a mistura da reação foi submetida ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) por 35 ciclos. Cada ciclo de amplificação consistiu de três etapas: desnaturação (92°C , 40 s), anelamento (40°C , 90 s) e extensão (72°C , 2 min.). O processo foi concluído com uma extensão final a 72°C por 5 min.

Após o processo de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,4%), realizada em tampão TBE 10X (108 g-Trisma-base, 55 g H_3BO_3 , 40 ml EDTA 0,5 M pH 8,0). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados em um transiluminador UV, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Os dados obtidos por amplificação aleatória de DNA (RAPD) foram analisados com o software NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (ROHLF, 2002), por meio do coeficiente de Jaccard (J) e pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average).

Meios de Cultivo

Foram desenvolvidos meios de cultivo a partir de soluções utilizadas para a nutrição de plantas e meio a base de insetos, cujas composições estão descritas na Tabela 4.1. As soluções nutritivas que serviram de base para os meios foram as de Sarruge (SARRUGE, 1975) (SNS) e de Hewitt (HEWITT, 1952) (SNH), preparadas em água destilada. A

concentração original de cada solução foi diluída em água destilada e as concentrações testadas foram de 5, 10, 25, 50 e 100% (v/v). Após as diluições, as soluções foram acrescidas de extrato de levedura (5 g l⁻¹), dextrose (10 g l⁻¹) e ágar (20 g l⁻¹).

Para o meio a base de insetos (MAD) foram utilizados adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) coletados em aviários em Londrina, PR. Os insetos foram mortos por congelamento, desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 2% e lavados em água destilada. Em liquidificador os insetos foram triturados em água destilada nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20% (p/v). Para a solidificação do meio foi utilizado ágar (20 g l⁻¹).

Tabela 4.1 – Composição dos meios de cultivo para produção de conídios de *Beauveria bassiana*.

Ingrediente	Meio de Cultivo ¹				
	SNS	SNH	MPE	BDA	MAD
Ágar (g)	20	20	20	20	20
<i>Alphitobius diaperinus</i> (g)	-	-	-	-	20
Batata (g)	-	-	-	200	-
Cloreto de cálcio (g)	0,3	-	-	-	-
Cloreto de potássio (g)	-	-	1,0	-	-
Dextrose (g)	10	10	10	20	-
Extrato de levedura (g)	5	5	5	-	-
Fe-EDTA (g)	-	4,21	-	-	-
Fosfato de potássio (g)	-	-	0,36	-	-
Fosfato de sódio (g)	-	1,2	1,05	-	-
Solução Estoque Hidrocoquetel ² (ml)	2,5	-	-	-	-
H ₃ BO ₃ (g)	-	0,006	-	-	-
MAP-monoamônio difosfato (g)	0,2	-	-	-	-
Molibdato de sódio (g)	-	0,024	-	-	-
Nitrato de cálcio (g)	0,8	4,72	-	-	-
Nitrato de potássio (g)	0,4	1,01	-	-	-
Nitrato de sódio (g)	-	-	1,58	-	-
Sulfato de cobre (g)	-	0,024	-	-	-
Sulfato de magnésio (g)	0,3	4,93	0,6	-	-
Sulfato de manganês (g)	-	0,169	-	-	-
Sulfato de zinco (g)	-	0,028	-	-	-
Solução Estoque Tensoferro ³ (ml)	0,9	-	-	-	-

¹Quantidade de ingrediente para 1 litro de meio (SNS e SNH a 100%, MAD a 20%); ²Solução Estoque Hidrocoquetel: B (2%), CoEDTA (0,8%), FeEDTA (5,6%), Mo (0,32%), MnEDTA (3,2%) ZnEDTA (2,0%); ³Solução Estoque Tensoferro: Fe (6,0% p/p), solubilidade em água a 20°C (180g l⁻¹), índice salino (45%), condutividade elétrica (78,0 mS/cm), pH a 25°C (7,0), EDDHSA (72%); SNS: solução nutritiva de Sarruge; SNH: solução nutritiva de Hewitt; MPE: meio para a produção de esporo de *Beauveria* spp; BDA: batata, dextrose, ágar; MAD: meio de *Alphitobius diaperinus*.

Para a comparação do desempenho dos meios, foram utilizados como testemunhas, o meio para a produção de esporos de *Beauveria* spp. (MPE) descrito por Alves et al (1998) e meio BDA (batata, dextrose, ágar). Antes da adição do ágar, o pH dos meios foi corrigido para sete com solução de NaOH (1N). Os meios foram esterilizados em autoclave por 30 minutos e vertidos em placas de Petri (5,2 cm Ø) esterilizadas.

Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios

O fungo foi repicado, com uma alça de platina pontiaguda, sobre o meio de cultivo em um ponto central da placa, a fim de se obter apenas uma colônia. As placas foram incubadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h). O crescimento vegetativo foi determinado pelo cálculo da área da colônia, feito com a média de dois diâmetros perpendiculares. Das mesmas colônias avaliou-se a produção de conídios. Esses foram removidos do meio com o auxílio de uma espátula, recolhidos em um tubo, suspensos em solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v) e submetidos à agitação em vortex por 30 segundos. Após as diluições necessárias, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. As avaliações foram realizadas no 14º dia para SNS e SNH. Para o meio MAD, devido a grande quantidade de micélio observada aos 14 dias, as avaliações foram realizadas em dois tempos de incubação, ao 14º e 21º dia.

As análises dos meios de soluções nutritivas e dos meios a base de insetos foram feitas separadamente. O delineamento experimental, para cada isolado, foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $(2\times 5)+2$, (meios \times concentrações) + testemunhas, para os meios de soluções nutritivas (SNS e SNH); e $(2\times 4)+4$, (dias \times concentrações) + testemunhas, sendo duas para cada dia de avaliação, em MAD. Para todos os tratamentos foram feitas cinco repetições.

As melhores concentrações foram utilizadas nos experimentos de produção de conídios em arroz, virulência, tolerância à radiação UV e à temperatura e composição química dos conídios.

Produção de Conídios em Arroz

Os meios SNS e SNH nas concentrações de 25 e 50%, e o meio MAD a 5 e 10%, foram preparados como no experimento anterior, sem a adição de ágar, em um volume final de 1 litro, que foram denominados de caldas nutritivas. Estas foram levadas ao aparelho

microondas em potência máxima até o ponto de ebulição. Nesse momento, 500 g de arroz parboilizado foi adicionado à calda nutritiva e cozido por três minutos, tempo suficiente para que os grãos atingissem uma consistência “emborrachada”. Na testemunha, o arroz foi cozido em água destilada. O líquido não absorvido pelo arroz foi escoado em peneira, imediatamente após o cozimento.

Em garrafas de vidro (500ml) foram colocados 65 g do arroz cozido. As garrafas foram tampadas com papel toalha, que foi preso ao gargalo por um elástico. Posteriormente, foram esterilizadas em autoclave por 30 minutos e, após o resfriamento em temperatura ambiente, cada garrafa foi inoculada com 1,5 ml de uma suspensão com $1,0 \times 10^7$ conídios ml^{-1} . As garrafas foram incubadas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h) por 15 dias. Para avaliar a produção de conídios, foram adicionados em cada garrafa 300 ml de uma solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v). As garrafas foram submetidas à agitação manual por três minutos e, após as diluições necessárias, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (7×3) (caldas nutritivas \times isolados), com quatro repetições.

Virulência a *Alphitobius diaperinus*

Adultos de *A. diaperinus*, em número de 50, foram acondicionados em placas de acrílico (6 cm Ø). Os insetos foram pulverizados (pulverizador Airbrush acoplado a um compressor/aspirador Fanem-DiaPump) com 0,5 ml da suspensão de 8×10^6 conídios ml^{-1} , que corresponde a CL_{50} estimada para esta praga pelo método de pulverização (SANTORO et al., 2007). Para inoculação, foram utilizados conídios do isolado Unioeste 4 produzidos nos meios MAD 10%, SNS 25%, SNH 25%, MPE e BDA, como descrito anteriormente. Na testemunha, os insetos foram pulverizados com uma solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v), utilizada como veículo da suspensão do fungo. Os insetos foram alimentados com ração de milho esterilizada e mantidos em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h). A avaliação foi realizada ao 10º dia e para confirmar a mortalidade pelo patógeno, os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por mais cinco dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições de 50 insetos por tratamento.

Tolerância à Temperatura

Os conídios do isolado Unioeste 4, produzidos em diferentes meios (MAD 10%, SNS 25%, SNH 25%, MPE e BDA) foram transferidos para tubos de ensaio esterilizados e acondicionados em câmara climatizada a $30\pm 1^\circ\text{C}$ por 0, 5, 10, 15 e 20 dias, em ausência de luz. A viabilidade dos conídios foi avaliada pelo teste de germinação, no qual 0,1 ml da suspensão com 1×10^7 conídios ml^{-1} foi espalhada, com alça de Drigalski, sobre a superfície do meio BDA, utilizado como meio padrão em todos os tratamentos.

As placas foram acondicionadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$, fotófase 12 h) e, após 20 h, aproximadamente 200 conídios, subdivididos em dois campos da placa, foram observados em microscópio óptico para quantificar o percentual de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (5×5) (meios de cultivo \times tempo de exposição), com quatro repetições.

Tolerância à Radiação UV

A viabilidade dos conídios do isolado Unioeste 4 produzidos nos diferentes meios (MAD 10%, SNS 25%, SNH 25%, MPE e BDA) foi avaliada após a exposição à radiação UV pelo teste de unidades formadoras de colônias (UFC). O meio padrão para avaliar as UFC foi o BDA, sobre o qual foi pipetado 0,1 ml da suspensão com 1×10^3 conídios ml^{-1} , que foi espalhada sobre a superfície com alça de Drigalski.

As placas, sem as tampas, foram colocadas em câmara de fluxo laminar sob lâmpada germicida (253,7 nm, Philips TUV, baixa pressão 30W) a uma distância de 52 cm. Os tempos de exposição à radiação foram 0, 1,5 e 3 minutos. As placas foram fechadas e acondicionadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h). Após cinco dias, avaliou-se o número de colônias formadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (5×3) (meios de cultivo \times tempo de exposição), com quatro repetições.

Composição Química dos Conídios

A composição química dos conídios foi avaliada para Unioeste 4 produzido *in vitro* em diferentes meios (MAD 10%, SNS 25%, SNH 25%, BDA e MPE) e *in vivo* sobre os insetos. Os conídios produzidos foram removidos da superfície do meio com o auxílio de uma espátula. Para a produção *in vivo* as espécies utilizadas foram *A. diaperinus* e *D.*

saccharalis, inoculadas por submersão em suspensão fúngica com $1,0 \times 10^7$ conídios ml^{-1} . Após a morte, os insetos foram acondicionados em câmara úmida climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por 10 dias, para plena esporulação do fungo sobre os cadáveres. Os conídios foram separados do corpo dos insetos por meio de agitação manual em um recipiente fechado, que continha um esquema de peneiras formado por seis camadas de tecido voil. Posteriormente, foram colocados em recipientes de vidro sem tampa e levados a estufa a 60°C até peso constante. Os teores dos elementos P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, Fe, S, C e N foram determinados pelo método de análise de tecido vegetal.

As determinações de P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, S e Fe foram feitas por digestão úmida nitroperclórica, em que 400 mg da amostra de conídios foi transferida para tubo digestor e adicionados 4 ml da mistura ácida [$\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1)]. Após quatro horas a mistura foi colocada em bloco digestor e aquecida lentamente até 50°C , até cessar a emissão dos gases da digestão, por aproximadamente 1 h. Após esta etapa, a temperatura foi elevada a 120°C , por cerca de 1 h e 30 min.. Em seguida, a temperatura foi elevada a 180°C até restar 1 ml de digerido. O conteúdo foi resfriado e o volume foi completado com água destilada até atingir 20 ml. A leitura do teor dos elementos foi feita em ICP-OES (Plasma Acoplado Indutivo/ Espectroscopia de Emissão Óptica) (MIYAZAWA et al., 2009).

O teor de N total foi determinado pelo método de Kjeldahl, por digestão sulfúrica via úmida, em que 100 mg da mostra de conídios, seca como descrito anteriormente, foi transferida para o tubo digestor, adicionado 1 g da mistura catalisadora de $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$ (10:1) e 1,5 ml de H_2SO_4 . O tubo foi transferido para o bloco digestor, aquecido lentamente até 380°C (entre 3 a 4 h), até a obtenção de um líquido esverdeado, com um volume final de aproximadamente 1 ml. Após esfriar, foram adicionados ao tubo 60 ml de água destilada e a mistura foi agitada. Desse extrato digerido, 1 ml foi pipetado e novamente diluído em 9 ml de água destilada. Em um tubo de ensaio, 1 ml do diluído foi acrescido de 6 ml de água destilada, 1 ml da solução de ácido salicílico (5%), 1 ml da solução de nitroprussiato de sódio (0,1%) e 1 ml da solução de NaOCl (0,15%). A mistura foi homogeneizada e após 60 min. Foi efetuada a leitura no espectrofotômetro UV-VIS a 697 nm (MIYAZAWA et al., 2009).

A determinação do carbono foi feita pelo método de Walkley-Black, em que 0,15 g da amostra de conídios seca foi transferida para erlenmeyer de 250 ml e adicionado 20 ml da solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N e 20 ml de H_2SO_4 concentrado. Após esfriar por 30 min., foi adicionada água destilada, 6 ml de H_3PO_4 concentrado e 0,5 ml do indicador difenilamina (1%). O teor de C foi determinado por titulação com solução de FeSO_4 1N até coloração verde (SILVA et al., 2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, e

devido à pequena quantidade de conídios produzido sobre os insetos foram feitas três repetições para cada uma das análises.

Análises Estatísticas

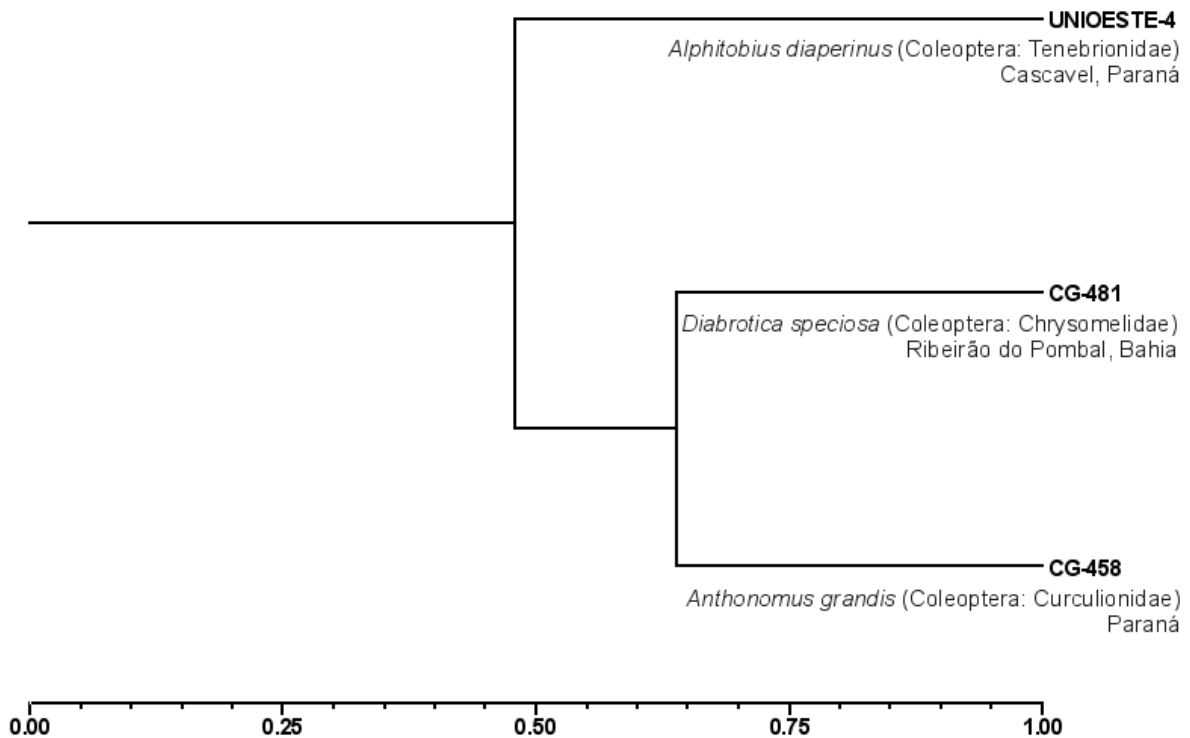
Os dados dos tratamentos com delineamento inteiramente casualizado, e inteiramente casualizado em esquema fatorial, foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As comparações entre as médias do fatorial com cada testemunha foram feitas pelo teste Dunnett ($p < 0,05$). A relação entre a produção de conídios (14 dias), a tolerância à radiação UV (3 min. de exposição), a tolerância à temperatura (20 dias de exposição), a virulência (mortalidade confirmada) e o teor endógeno dos elementos químicos nos conídios, foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson, que mede o grau de associação linear entre duas variáveis.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Molecular dos Isolados de *B. bassiana*

Pela caracterização molecular por RAPD foram verificadas diferenças entre os perfis genéticos dos isolados. Apesar das diferenças entre as origens geográficas e os hospedeiros, os isolados CG 458 e CG 481 apresentaram uma similaridade genética de aproximadamente 65%. Já a similaridade entre o Unioeste 4 e esses dois isolados foi próxima a 45% (Figura 4.1). A variabilidade genética inter e intraespecífica é uma das principais vantagens apresentadas pelos fungos entomopatogênicos, pois possibilita a seleção de isolados virulentos e mais adaptados às condições ambientais onde o patógeno será aplicado, as quais podem ser limitantes à eficácia do fungo (ALVES, 1998).

Figura 4.1 – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, constituído por isolados de *Beauveria bassiana*, com diferentes hospedeiros e origem geográfica.



Mesmo com alta similaridade genética entre os isolados CG 458, CG 481 e Unioeste 4, eles apresentaram comportamentos distintos em relação às variáveis avaliadas neste trabalho (Figuras 4.2; 4.3; 4.4, 4.5, 4.6), o que mostra que, apesar da espécie *B. bassiana* ser pouco exigente em relação às condições nutricionais de cultivo (LEITE et al., 2003), cada isolado pode apresentar preferência por determinados meios que irão proporcionar um melhor desenvolvimento do fungo. Assim, ao selecionar um isolado altamente virulento para uma determinada praga, é importante definir qual a melhor condição nutricional para o seu cultivo, a fim de viabilizar sua produção em larga escala.

Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios

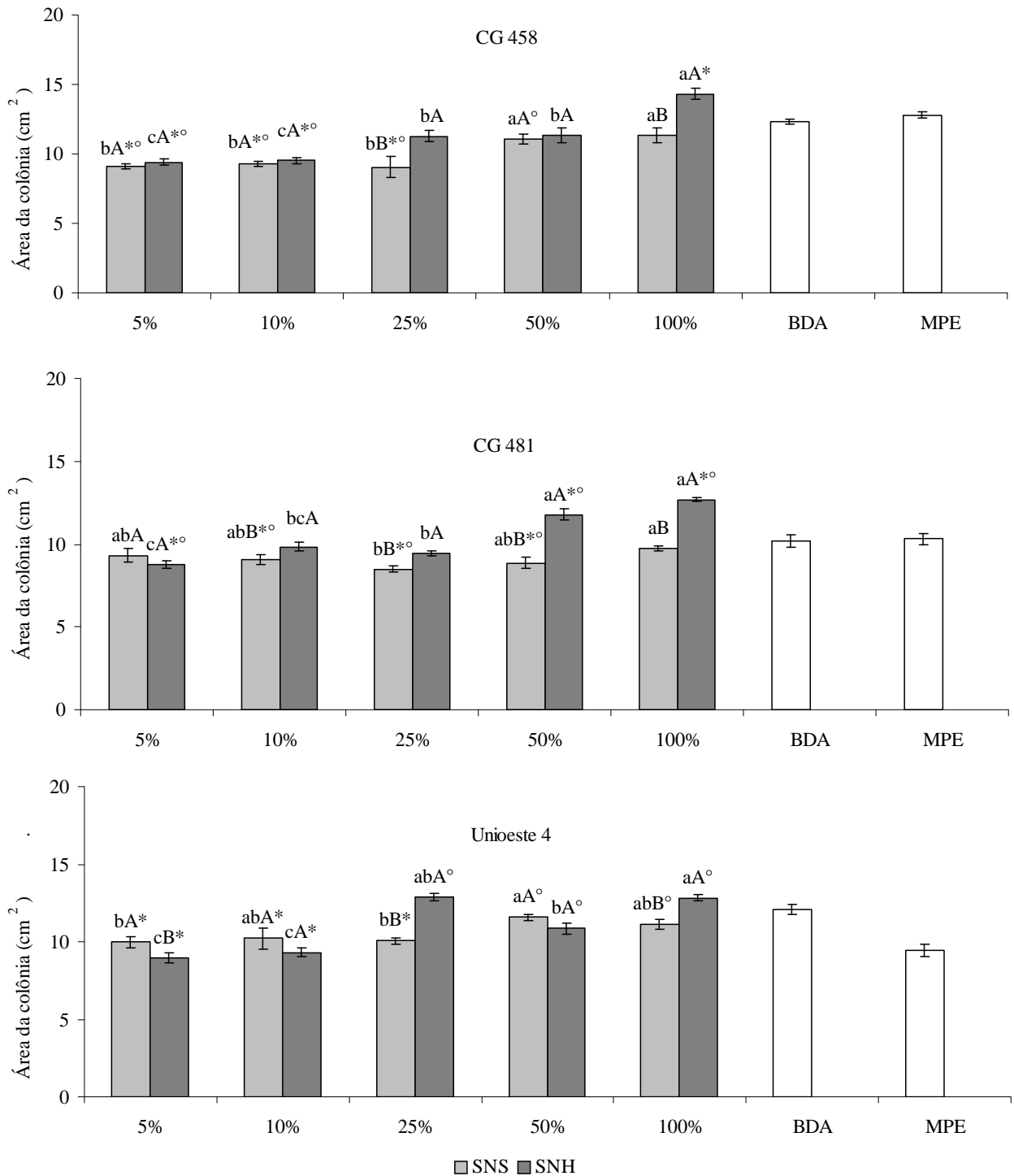
Meios de soluções nutritivas (SNS e SNH)

Foi constatado que as necessidades nutricionais de *B. bassiana* variam para os diferentes isolados (Figura 4.2, 4.3), o que pode estar associado a variabilidade genética

entre eles (Figura 4.1). A maioria dos trabalhos que comparam o crescimento vegetativo e produção de conídios entre isolados de uma mesma espécie evidencia esta variabilidade nas respostas em relação às condições de cultivo (BARBOSA et al., 2002; DAMIR, 2006; LOUREIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2004).

Compreender como a nutrição afeta o desenvolvimento do fungo pode favorecer os programas de manejo de pragas que pretendem utilizar os fungos entomopatogênicos para o controle biológico de pragas. As condições de cultivo que favoreçam a alta produção de propágulos infectivos são essenciais para a produção em larga escala e para a competitividade dos produtos comerciais.

Figura 4.2 – Crescimento vegetativo *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=8,79%), CG 481 (CV=6,00%) e Unioeste 4 (CV=7,10%)] em diferentes meios e concentrações, após 14 dias de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios uma mesma concentração, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); SNS e SNH: meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente.

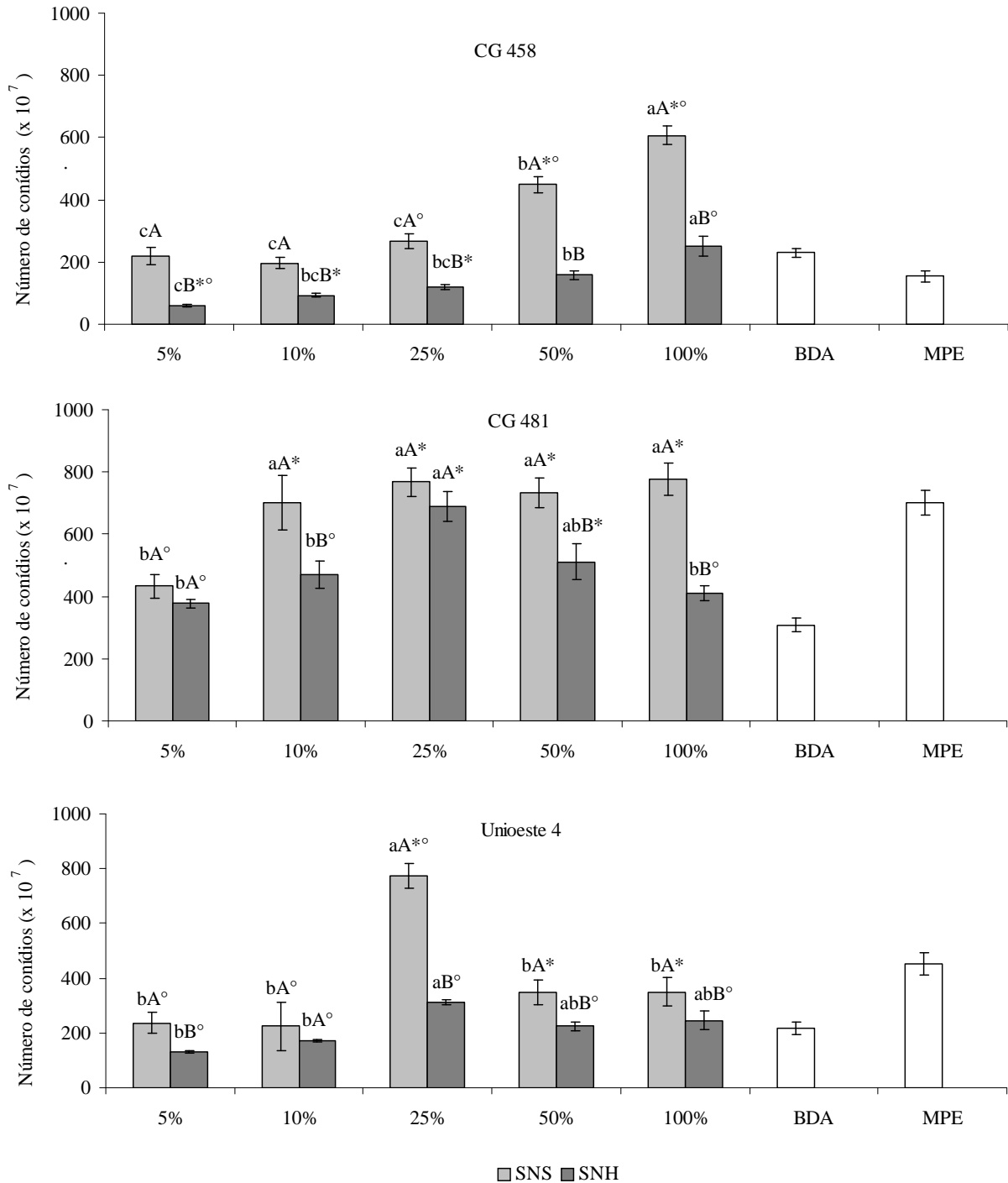


As diferenças entre os meios de cultivos, as concentrações e as interações entre esses fatores foram significativas. A característica de crescimento da grande maioria dos fungos entomopatogênicos é claramente afetada pelo suprimento de nutrientes (HUMBER, 2008). O crescimento vegetativo de *B. bassiana* nos meios SNS e SNH foi favorecido pelas altas concentrações de nutrientes, principalmente a 50 e 100%. Apenas para o isolado CG 481, no meio SNS, não houve diferença entre as concentrações testadas. Para a maioria dos tratamentos o meio SNH foi melhor que SNS. Esses meios não diferiram entre si nas concentrações de 5, 10 e 50% para CG 458; 5% para CG 481; e 10 e 50% para Unioeste 4. O meio SNS foi superior ao SNH apenas para o isolado Unioeste 4, na concentração de 5% (Figura 4.2). As áreas das colônias nos meios SNS e SNH variaram de 8,50 e 14,32 cm². Quando comparados ao meio BDA, o crescimento vegetativo foi maior em SNH 100% para CG 458, e em SNH 50 e 100% para CG 481. E comparados ao MPE, foi superior no meio SNH 50 e 100% para CG 481; SNS 50 e 100% e SNH 25, 50 e 100% para Unioeste 4. Os demais tratamentos não diferiram ou foram inferiores aos meio BDA e MPE.

A produção de conídios foi maior nas concentrações mais elevadas, exceto para o isolado CG 481 em SNH e para o Unioeste 4 em SNS, que tiveram maior produção nas concentrações de 25 e 10%, respectivamente. Apesar do meio SNS ter apresentado um menor crescimento vegetativo para a maioria dos tratamentos, ele promoveu uma maior produção de conídios, exceto a 5 e 25% para CG 481 e em 10% para Unioeste 4, onde não diferiu de SNH (Figura 4.3). O meio que favorece o crescimento micelial nem sempre proporciona a melhor produção de conídios (SAFAVI et al., 2007). A produção é dependente do isolado do fungo e da nutrição durante o seu cultivo e não está relacionada com o crescimento vegetativo (MUSTAFA; KAUR, 2009; SHAH et al., 2005). Isso evidencia o delicado processo de interação entre os ciclos vegetativo e reprodutivo, mostrando que em algumas situações o melhor é optar por uma condição nutricional intermediária (JABOR et al., 2003).

Alguns trabalhos sugerem que a presença de nitratos pode favorecer a formação de propágulos de *B. bassiana* (FENG et al., 1994; THOMAS et al., 1987). No entanto, os resultados deste trabalho mostram que em altas concentrações, os nitratos podem ser prejudiciais. Os meios SHS e SNH, apresentam em sua composição a presença de nitratos de sódio e de potássio, porém em concentrações diferentes (Tabela 4.1). No meio SNH a concentração de nitrato de cálcio foi aproximadamente seis vezes superior que em SNS, e a concentração de nitrato de potássio foi 2,5 vezes maior. Apesar das altas concentrações de nitratos em SNH, esse meio foi menos produtivo que SNS.

Figura 4.3 – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios colônia⁻¹) *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=19,82%), CG 481 (18,97%) e Unioeste 4 (CV=23,81%)] em diferentes meios e concentrações, após 14 dias de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios uma mesma concentração, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); SNS e SNH: meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente.



O nitrogênio é indispensável para o desenvolvimento dos fungos, sendo necessário para a síntese de componentes celulares importantes, como aminoácidos, ácidos nucleicos e quitina (GARRAWAY; EVANS, 1984), o que pode explicar o maior crescimento vegetativo em SNH, porém, a privação desse elemento durante o cultivo é considerada um indutor da produção de conídios (KRASNIEWSKI et al., 2006) e assim, um maior tempo de incubação, que possibilitasse a redução de N no meio de cultivo após seu consumo pelo crescimento vegetativo, induziria uma maior produção de conídios.

Um dos fatores que pode ter favorecido um melhor desempenho de SNS, além da menor concentração de N disponível, é a presença de CaCl_2 na composição desse meio, já que esta molécula é conhecida como um ativador da produção de conídios de vários fungos (VIDAL et al., 1998). Kondryatiev et al. (1971) comprovaram a exigência de íons Ca^{++} para *B. bassiana* (apud VIDAL et al., 1998). Apesar destas evidências, é difícil afirmar com precisão o que favoreceu a produção de conídios, pois os microrganismos utilizam para sua sobrevivência uma mistura equilibrada dos nutrientes e se um elemento essencial estiver abaixo da quantidade necessária, seu crescimento será limitado, independentemente das concentrações de outros nutrientes (MUSTAFA; KAUR, 2009).

Comparados ao meio BDA, a produção de conídios foi maior em SNS 50 e 100% para CG 458; em 10, 25, 50 e 100% para CG 481; e em 25, 50 e 100% para Unioeste 4. No meio SNH foi superior apenas em 25 e 50% para CG 481. Para a maioria desses tratamentos, o incremento da produção de conídios, em comparação ao BDA, foi superior a 50%. A maior diferença foi para o isolado Unioeste 4, que produziu $774,90 \times 10^7$ conídios colônia⁻¹ no meio SNS 25% e $218,60 \times 10^7$ em BDA. Quando comparados ao MPE, a produção foi maior em SNS 25, 50 e 100% para CG 458; e a 25% para Unioeste 4. No meio SNH, a produção foi superior apenas em 100% para CG 458. Altas produções ocorreram, principalmente, para CG 481 no meio SNS, com valores que chegaram a $776,85 \times 10^7$ conídios colônia⁻¹, entretanto não diferiram de MPE que também propiciou elevada produtividade para esse isolado, com $702,20 \times 10^7$ conídios colônia⁻¹. Já para o meio SNH, em todas as concentrações, a produção foi menor que em MPE (Figura 4.3).

Foi observado no meio BDA que, apesar de ter apresentado áreas de colônias superiores a muitos tratamentos para os três isolados, estas continham em sua superfície uma massa micelial menos espessa que as colônias de SNS, SNH e MPE. Isso mostra que a área da colônia é um indicativo do crescimento vegetativo, mas nem sempre reflete o real desenvolvimento do fungo no que se refere à quantidade de micélio. Esse pode ser um dos motivos pelo qual o crescimento vegetativo normalmente não esteja

correlacionado com a produção de conídios. Existem informações de que o N é necessário para o crescimento micelial (SMITH; GRULA, 1981) e há uma tendência de maior produção de conídios em meios ricos em C (ENGELKES et al., 1997).

O meio BDA é rico em C, pois além da adição de 20g de dextrose (Tabela 4.1), a batata apresenta em sua composição carboidratos e amido, que somados correspondem a 30% de sua composição. Já as proteínas, que são fontes de N, representam menos de 3% (QUADROS et al., 2009). Apesar do C ser fundamental na produção de conídios, o fornecimento de N no meio BDA não foi suficiente para promover um efetivo crescimento micelial, o que refletiu na menor produção de conídios. Esses resultados revelam que é necessário existir um equilíbrio na disponibilidade desses elementos no meio de cultivo.

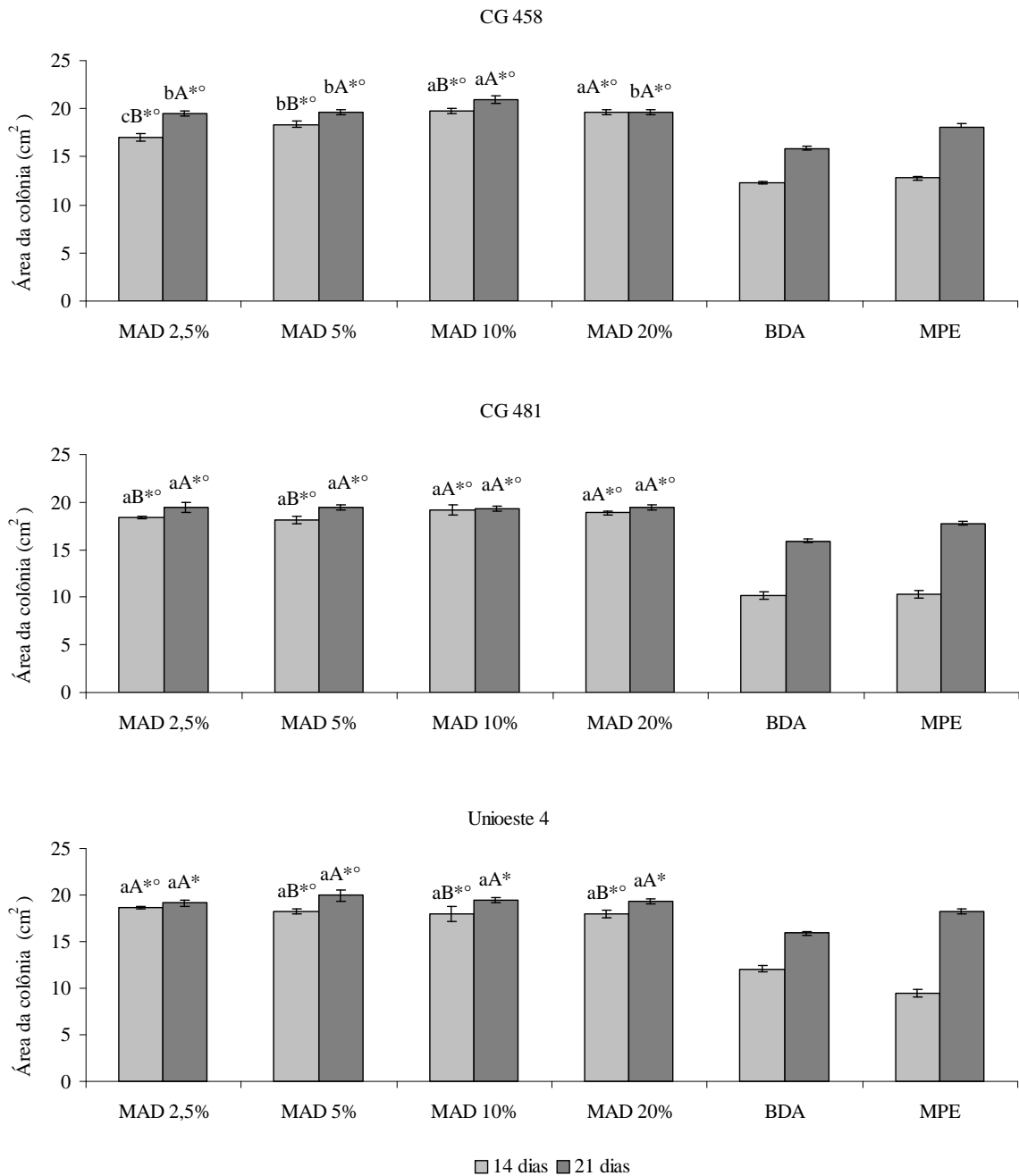
As observações feitas em relação ao crescimento vegetativo mostram que, além da área ocupada pela colônia que, é um indicador normalmente utilizado na maioria dos trabalhos, é necessário determinar a massa micelial. A utilização destas duas variáveis, para dimensionar o crescimento vegetativo, poderá apresentar uma maior correlação com a produção de conídios, servindo como um indicador.

Meio a base de insetos (MAD)

Para o crescimento vegetativo e produção de conídios, o melhor desempenho dos três isolados ocorreu, para a maioria dos tratamentos, aos 21 dias. As diferenças entre 14 e 21 dias foram mais acentuadas para produção, principalmente nas maiores concentrações de MAD. Assim como nos meios SNS e SHN, esses resultados indicam respostas diferenciadas entre isolados, que mostraram preferências específicas por um determinado meio e/ou concentração.

O crescimento vegetativo para o isolado CG 458 foi maior em MAD a 10 e 20% aos 14 dias e a 10% aos 21 dias. Para CG 481 e Unioeste 4, não houve diferença entre as concentrações de MAD nos dois tempos de avaliação. O meio MAD favoreceu o crescimento vegetativo em comparação ao meio BDA, sendo superior em todos os tratamentos. Em relação ao MPE, MAD foi superior em todas as concentrações para os isolados CG 458 e CG 481, aos 14 e 21 dias, e para Unioeste 4 aos 14 dias. Apenas para esse isolado, aos 21 dias, não houve diferença entre MPE e MAD nas concentrações de 2,5, 10 e 20% (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Crescimento vegetativo *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=3,56), CG 481 (CV=4,31) e Unioeste 4 (CV=5,17)] no meio MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), em diferentes concentrações e tempos de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo tempo de incubação, e maiúsculas comparam os tempos de incubação em uma mesma concentração, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

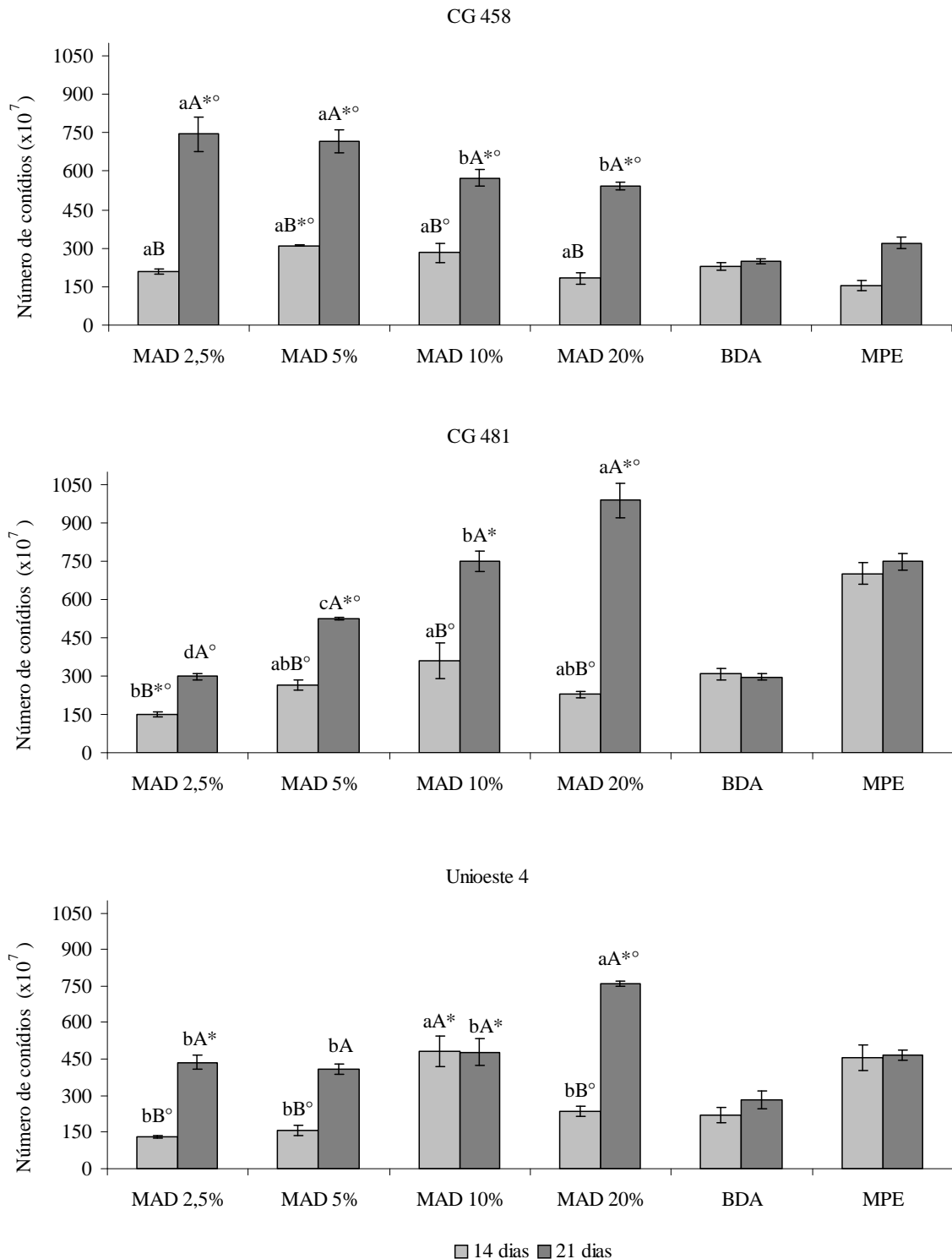


Os insetos são ricos em proteínas (40 a 75%) (VERKERK et al., 2007) e esta fonte de N pode ter favorecido o crescimento vegetativo em MAD, tanto em relação à área da colônia, quanto em relação à formação micelial, que foi visualmente mais espessa que nos meios BDA e MPE. No início do desenvolvimento, *B. bassiana* o C é necessário para promover a germinação, já o N propicia o crescimento das hifas (SMITH; GRULA, 1981).

Além de favorecer o crescimento vegetativo, o meio MAD proporcionou maior produção de conídios, principalmente no maior período de incubação. A produção em MAD aos 14 dias, para CG 458, não apresentou diferença entre as concentrações, e aos 21 dias foi superior em 2,5 e 5%. Para CG 481, as melhores concentrações, aos 14 dias, foram 5, 10 e 20%, e aos 21 dias foi a de 20%. Para Unioeste 4, aos 14 dias, a produção foi maior em 10%, e aos 21 dias foi maior em 20%. A maior diferença entre os tempos de incubação foi observada para o isolado CG 481 em MAD a 20%, que foi cerca de quatro vezes maior aos 21 dias (Figura 4.5). Na comparação com o meio BDA, a produção em MAD aos 14 dias foi superior apenas para CG 458 em 5% e Unioeste 4 em 10%. Aos 21 dias, a produção em MAD foi maior para a maioria dos tratamentos, exceto para CG 481 em 2,5% e Unioeste 4 em 5%, que não diferiram de BDA. Quando comparados ao meio MPE, a produção em MAD aos 14 dias foi maior para CG 458 em 5 e 10%. Aos 21 dias, foi maior para CG 458 em todas as concentrações; para CG 481 em 10 e 20%; e para Unioeste 4 a 20% (Figura 4.5).

Alguns autores sugerem que os meios nutricionalmente pobres induzem uma maior produção de conídios (CAIXETA et al., 2008; DHINGRA; SINCLAIR 1995; KAMP; BIDOCHKA, 2002). Entretanto, com as avaliações aos 14 e 21 dias, foi possível concluir que o tempo de incubação é fundamental para que o fungo manifeste seu potencial produtivo nas diferentes condições nutricionais, principalmente nos meios ricos, que nesse caso foi associado às concentrações mais elevadas de insetos em MAD. Um período de incubação maior possibilitou ao fungo o melhor aproveitamento dos nutrientes, favorecendo um amplo crescimento micelial. A redução dos nutrientes no meio, decorrente da utilização pelo entomopatôgeno durante o seu crescimento vegetativo, pode ter criado uma condição de estresse que induziu a produção dos conídios para garantir a perpetuação da espécie. Esses resultados revelam que não são os meios pobres que induzem a alta produção de conídios, mas que esta é dependente de um bom crescimento vegetativo que é favorecido por meios mais ricos, e está intimamente relacionado a um maior tempo de incubação. Esta informação é importante para o processo de produção, em pequena e em larga escala, onde o tempo de incubação vai depender do meio de cultivo que se utiliza.

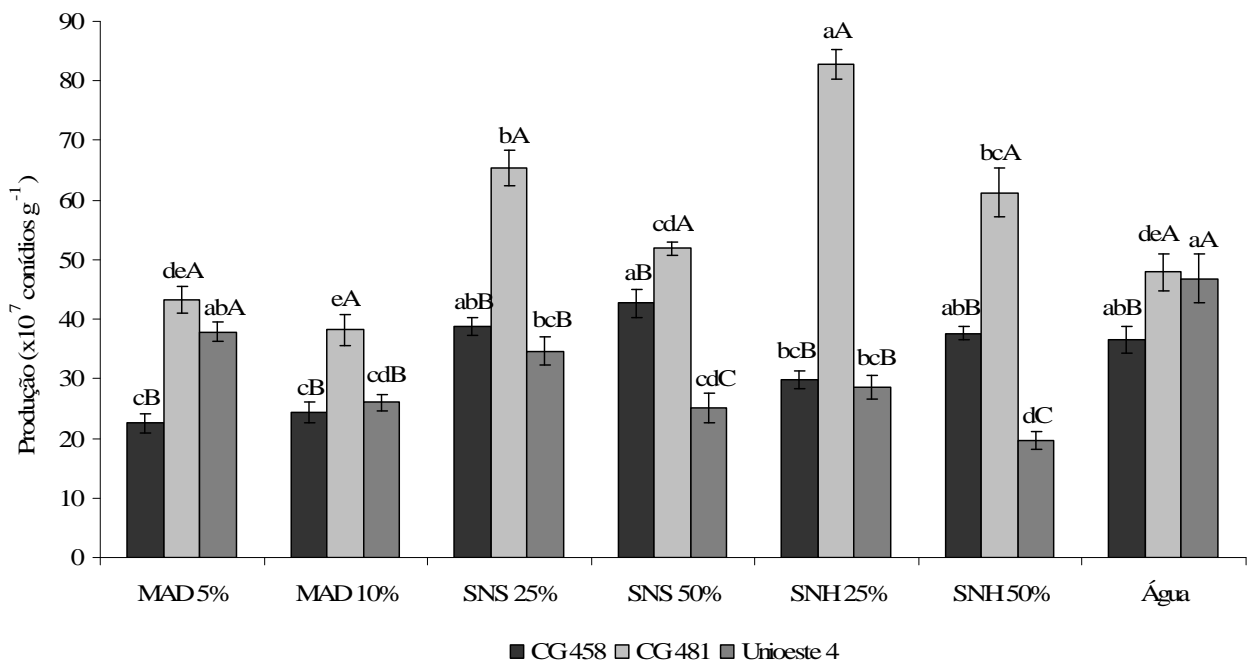
Figura 4.5 – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios colônia⁻¹) *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana* [CG 458 (CV=17,71), CG 481 (CV=19,08) e Unioeste 4 (CV=19,61)] no meio MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), em diferentes concentrações e tempos de incubação; letras minúsculas comparam as concentrações em um mesmo tempo de incubação, e maiúsculas comparam os tempos de incubação em uma mesma concentração, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *difere de BDA (batata, dextrose, ágar), e °difere de MPE (meio para Produção de *Beauveria* spp), ambos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).



Produção de Conídios em Arroz

A adição de nutrientes na calda de cozimento do arroz não favoreceu a produção de conídios para CG 458 e Unioeste 4, que foi menor que a testemunha em MAD 5 e 10% para CG 458; e em MAD 10%, SNS 25 e 50%, SNH 25 e 50% para Unioeste 4. Para o isolado CG 481, observou-se, em relação à testemunha, um incremento de 73% em SNH 25%, seguido de SNS 25% e SNH 50%, que não diferiram entre si. Nos cultivos em placa de Petri, estas mesmas concentrações de SNS e SNH também foram responsáveis por uma alta produção de conídios, mostrando a preferência desse isolado por esses nutrientes e concentrações. O isolado CG 481, que melhor respondeu ao cozimento do arroz em caldas nutritivas, também foi o mais produtivo para a maioria dos tratamentos na comparação entre os isolados (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* em arroz cozido em calda com insetos triturados e soluções nutritivas, em diferentes concentrações, após 15 dias de incubação; letras minúsculas comparam os meios para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em um mesmo meio, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 11,78\%$); MAD (calda a base de *Alphitobius diaperinus*); SNS e SNH (caldas a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente).



Os componentes nutricionais, bem como a quantidade de nutrientes disponíveis tem efeito sobre o crescimento vegetativo, a produção de conídios e a morfologia dos fungos entomopatogênicos (KAMP; BIDOCHKA, 2002). A maior produção de conídios dos isolados CG 458 e Unioeste 4 no arroz cozido em água, pode ter sido estimulada pela menor disponibilidade de nutrientes, que devido ao esgotamento promoveu a produção de conídios. Já nos tratamentos em que o arroz foi cozido nas caldas nutritivas, foi observada uma maior formação de micélio sobre os grãos, e provavelmente, após um tempo maior de incubação a produção de conídios poderia ser mais elevada, assim como ocorreu no experimento anterior, em que o tempo de incubação favoreceu a produção de conídios em MAD. No Brasil, os grãos de arroz tem sido o substrato mais utilizado para a produção de fungos entomopatogênicos em larga escala, principalmente devido ao baixo custo (ALVES; PEREIRA, 1998; LEITE et al., 2003), e o cozimento do arroz na calda nutritiva SNH 25% pode ser vantajoso devido ao aumento de 73% na produção.

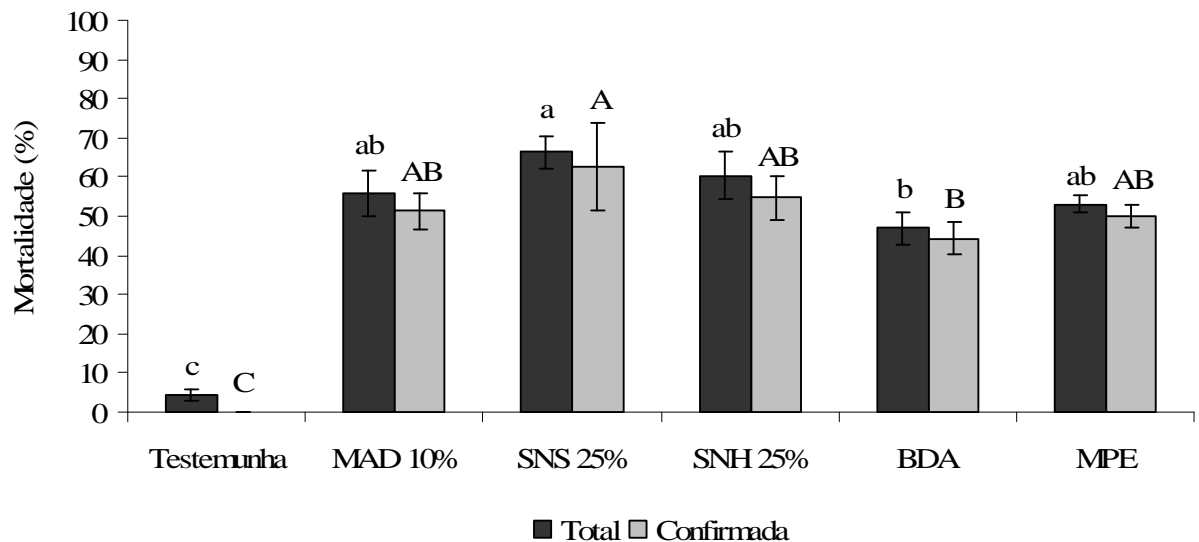
Virulência a *Alphitobius diaperinus*

Os meios de cultivo influenciaram na virulência do isolado Unioeste 4 a adultos de *A. diaperinus*. Entre os tratamentos com fungo, foram constatadas diferenças apenas entre os SNS 25% e BDA, com mortalidade aproximadamente 18% superior em SHS 25% (Figura 4.7). Esses tratamentos não diferiram dos demais, que apresentaram valores intermediários de mortalidade. As diferenças entre a mortalidade total e confirmada, para todos os tratamentos, foram inferiores a 5%. O valor desta diferença foi próximo ao observado para a mortalidade total na testemunha, com 4,33%. Os valores de mortalidade observados nesse trabalho, próximos a 50%, foram esperados devido à utilização da CL50 pré-determinada para a praga (SANTORO et al., 2007).

A menor virulência pode ser decorrente da redução da velocidade de germinação dos conídios (HASSAN; CHARNLEY, 1989; MUSTAFA; KAUR, 2009; SAFAVI et al., 2007) e segundo Rangel et al. (2004), esta velocidade pode ser influenciada pelas reservas endógenas acumuladas nos conídios durante o cultivo. Nesse aspecto, a germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) produzidos sobre cadáveres de insetos foi mais lenta que os produzidos em meio sintético rico em nutrientes (RANGEL et al., 2004). E para *B. bassiana*, a virulência de conídios produzidos no hospedeiro foi menor que a dos produzidos em arroz e em meio sintético (SANTORO et al., 2007). Os resultados obtidos por Rodríguez-Gomes et al. (2009) revelaram que conídios desta espécie, produzidos

em SDA (sabouraud, dextrose, ágar) foram mais virulentos do que os produzidos em meio complexo com quitina, com exoesqueleto de insetos e sobre farelo de trigo.

Figura 4.7 – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus*, por conídios de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzidos em diferentes meios, ao décimo dia após a aplicação; letras minúsculas comparam os meios para a mortalidade total (CV=21,58%), e maiúsculas comparam os meios para a mortalidade confirmada (CV=22,52%), ambas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); MAD (meio de *Alphitobius diaperinus* a 10%); SNS e SNH (meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, a 25%, respectivamente); BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporo de *Beauveria* spp).



A composição química dos conídios mostram que as diferenças mais acentuadas entre os conídios produzidos em BDA e SNS 25% foram em relação aos teores de K (> em BDA), Ca (> em SNS 25%), Cu (> em BDA), Zn (> em BDA), Fe (> em SNS 25%), S (> em BDA), C (> em BDA) e relação C:N (> em BDA) (Tabela 4.2). Os elementos Ca, H, C, N, O, P, S, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu e Mb são considerados essenciais para o desenvolvimento dos fungos, entretanto os íons Fe, Cu, Zn, S, em baixos níveis, podem agir como catalisadores do crescimento, porém, em excesso, tornam-se prejudiciais aos fungos (LACAZ et al., 1970; SILVEIRA 1995). A análise de Pearson mostra que a virulência está positivamente correlacionada com a produção dos conídios, entretanto é afetada negativamente pelo aumento do teor de enxofre nos conídios.

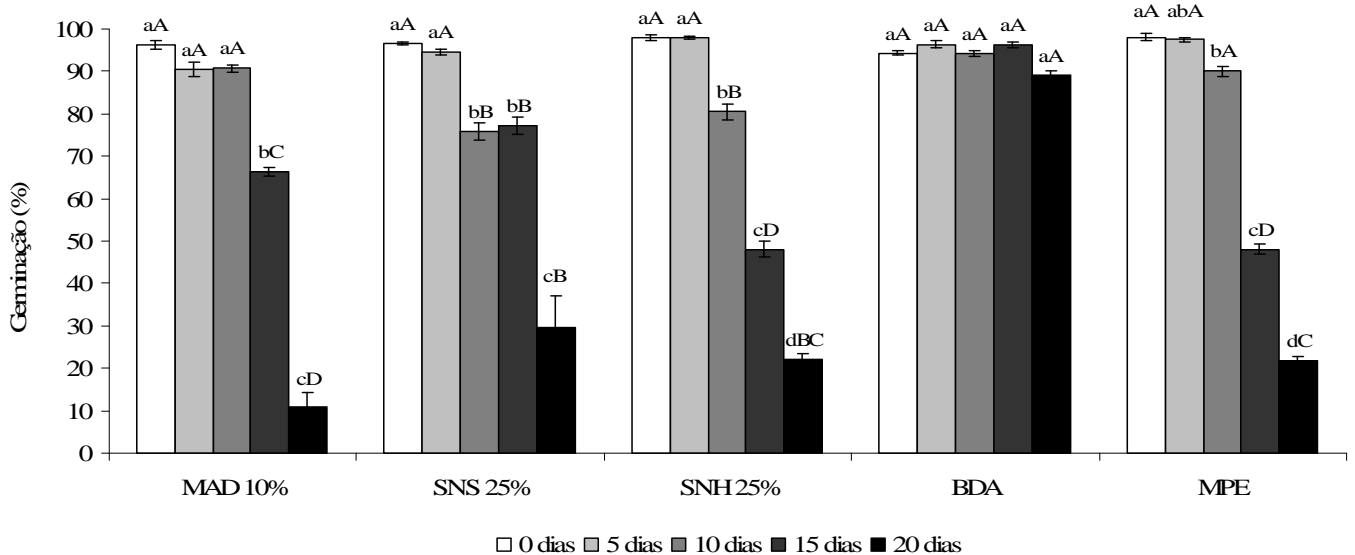
Shah et al. (2005) consideram que a relação C:N é um indicador de virulência. Esses autores observaram que conídios com as menores relações C:N (4,05 a 5,15) foram mais virulentos que os conídios com relação C:N de 6,35 a 6,84. Esta relação para os conídios produzidos em SNS 25% (mais virulentos) foi de 4,45, enquanto que a relação C:N para os conídios de BDA (menos virulentos) foi de 7,35. Apesar da semelhança entre esses resultados, a correlação entre virulência e relação C:N, pelo coeficiente de Pearson, não foi significativa (Tabela 4.3).

Tolerância à Temperatura

Após o armazenamento a 30°C a viabilidade dos conídios reduziu com o aumento do tempo de exposição, exceto para os provenientes do meio BDA, que não foram afetados pela temperatura de 30°C durante os períodos de armazenagem avaliados. O meio de cultivo onde os conídios foram produzidos não afetou a viabilidade inicial, com valores de germinação acima de 94%. Os conídios produzidos no meio MAD 10% apresentaram redução da viabilidade no 15º dia. Para os meios SNS 25%, SNH 25% e MPE a redução ocorreu a partir no 10º dia. Ao 20º dia, a maior redução foi para os conídios produzidos no meio MAD 10%, com 11,02% de viabilidade, e a maior tolerância foi para BDA, com 89,02% de conídios viáveis (Figura 4.8).

Fisiologicamente, a termotolerância está intimamente relacionada com o acúmulo endógeno de trealose nos fungos (HALLSWORTH; MARGAN, 1995; SINGER; LINDQUIST; 1998). A trealose é um carboidrato e seu acúmulo nos conídios pode ser induzido pelo cultivo do fungo em condições limitadas de nutrientes (LENG et al., 2011). Entretanto, outros constituintes do meio também parecem ter influência sobre a termotolerância. A suplementação do meio de cultivo com óleos, sais inorgânicos, carboidratos e sorbitol aumentaram a termotolerância dos conídios, entretanto reduziram a produção (KIM et al., 2010). Um meio contendo glicose ou amido, como fonte de carbono, produziu conídios com maior termotolerância que aqueles produzidos em meio com sacarose (YING; FENG, 2006).

Figura 4.8 – Viabilidade de conídios (germinação %) de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzidos em diferentes meios após armazenagem a 30°C por diferentes tempos (dias); letras minúsculas comparam os tempos para um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 5,15\%$); MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*); SNS e SNH (meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente); BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporo de *Beauveria* spp).



A maior termotolerância dos conídios produzidos em meio BDA está fortemente correlacionada com o alto teor de carbono nos conídios, provavelmente devido à presença de amido e outros carboidratos proveniente da batata, além da adição de dextrose (Tabela 4.3), o que corrobora com os resultados obtidos por Ying e Feng (2006). Kim et al. (2010) acreditam que a adição de carboidrato no meio favoreça o acúmulo de trealose nas células fúngicas. Os conídios mais tolerantes, produzidos em meio BDA, foram os que apresentaram maior acúmulo de C e relação C:N, ao contrário dos conídios produzidos em MAD, que foram menos tolerantes, e continham em sua composição os menores teores de C e relação C:N.

Conídios que apresentem a característica de termotolerância também são importantes durante o processo infeccioso, pois alguns insetos podem elevar a temperatura do corpo acima da temperatura ambiente, em especial quando doentes, quer como parte de sua resposta imune inata ou se aquecendo ao sol, um fenômeno denominado "febre comportamental" (HEINRICH, 1995; ROY et al., 2006). O aumento da temperatura corporal é uma maneira eficaz de afastar as infecções fúngicas (CRECY et al., 2009), uma vez que a

maioria dos fungos utilizados no controle biológico apresenta limite térmico para germinação e crescimento de 32 a 34°C (FARGUES et al., 1996; OUEDRAOGO et al., 1997).

Além das características de alta virulência e tolerância à radiação UV, que estão correlacionadas, o sucesso do controle biológico depende também da termotolerância dos conídios, principalmente em países de clima tropical. Esta característica pode ser melhorada por meio da manipulação das condições nutricionais de cultivo. O incremento da termotolerância pelo uso de meios de cultivos apropriados e o uso de formulações que protejam o fungo das altas temperaturas são estratégias que devem ser associadas para melhorar eficiência do fungo no campo.

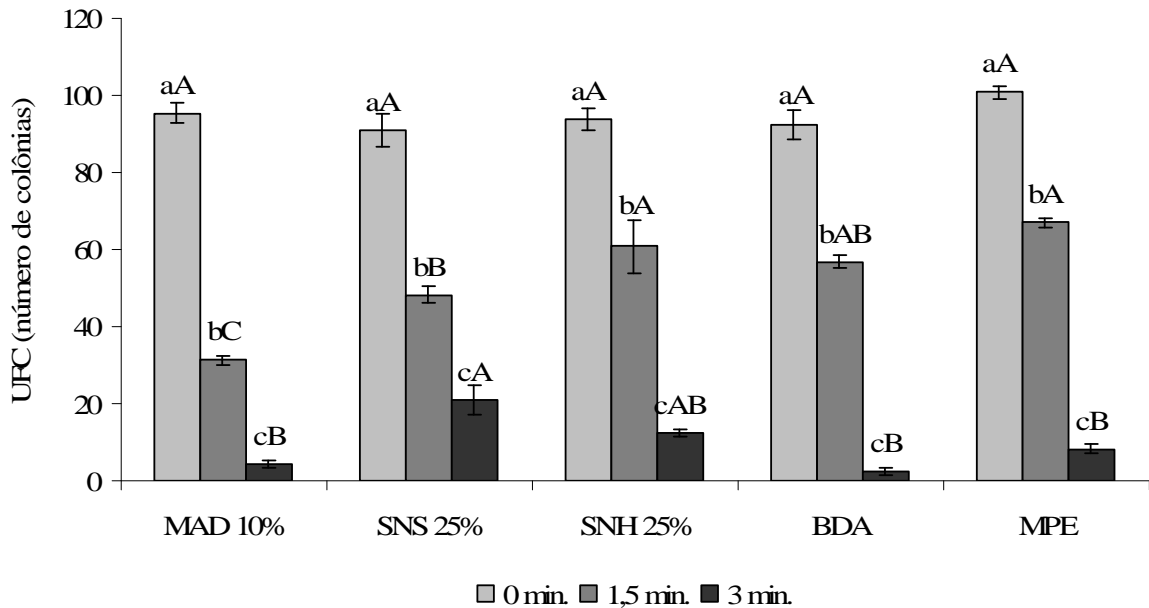
Tolerância à Radiação UV

O principal método utilizado para avaliar o efeito da radiação UV sobre os fungos é a germinação após a exposição (BRAGA et al., 2002; FARGUES et al., 1996; MOORE et al., 1993; ZIMMERMANN, 1982). Entretanto, esse método pode mascarar os resultados obtidos, pois segundo Nascimento et al. (2010), a exposição à radiação provoca um atraso na germinação dos conídios sobreviventes. Por este motivo, o método utilizado para avaliar a viabilidade foi o teste de UFC, com contagem das colônias após cinco dias.

A viabilidade dos conídios provenientes dos diferentes meios de cultivo foi reduzida com o aumento do tempo de exposição à radiação UV. Não houve diferença entre a viabilidade dos conídios antes da exposição à radiação (tempo 0), com número de UFC superior a 90. Após 1,5 minutos, os conídios que apresentaram menor tolerância foram os provenientes do meio MAD 10%, que passou de 95,25 para 31,25 UFC. Os mais tolerantes foram os provenientes dos meios MPE, SNH 25% e BDA, que não diferiram entre si, com 67,00, 60,75 e 56,75 UFC, respectivamente. Quando expostos à radiação UV por três minutos, os mais tolerantes foram os provenientes do meio SNS 25% e SNH 25%, que não diferiram entre si, com 21,00 e 12,25 UFC, respectivamente (Figura 4.9).

A eficiência de controle de pragas pelo uso dos fungos entomopatogênicos depende, não só de funções fisiológicas, bioquímicas e moleculares, mas também das condições ambientais (FENG et al., 1994; KHACHATOURIANS et al., 2002). Durante a aplicação, a principal preocupação é a luz solar, que causa inativação do fungo pela radiação UV. Um dos fatores da inativação é a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano no DNA (CHELICO et al., 2005).

Figura 4.9 – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzida em diferentes meios, após exposição à radiação UV por diferentes tempos; letras minúsculas comparam os tempos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo tempo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($CV = 11,06\%$); MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*); SNS e SNH (meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente); BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporo de *Beauveria* spp).



Características fenotípicas de natureza quantitativa, como a tolerância à radiação UV, tem uma base genética complexa e geralmente são influenciadas pelo ambiente. Assim, uma possibilidade interessante para aumentar a tolerância à radiação é a manipulação das condições físicas e/ou químicas do meio de cultura para a produção de conídios (RANGEL et al., 2004), considerando que os nutrientes são substâncias utilizadas na biossíntese e liberação de energia e estão relacionados com a sobrevivência dos organismos (SAFAVI et al., 2007).

São poucas as referências sobre os efeitos das condições nutricionais de cultivo sobre a tolerância de fungos à radiação UV. Um dos primeiros trabalhos foi realizado por Rangel et al. (2004) para a espécie *M. anisopliae*, que apresentou maior viabilidade para os conídios produzidos em BDA+ extrato de levedura, em comparação aos produzidos sobre o inseto hospedeiro. Neste trabalho, no tempo de exposição de 1,5 minutos foi possível observar que os conídios produzidos no meio MAD 10%, constituído por insetos, também foram menos tolerantes. Mais recentemente, Ottati-de-Lima et al. (2010) verificaram que na farinha

de milho amarela foram obtidos conídios mais tolerantes à UV e mais virulentos. Estas respostas corroboram as obtidas neste trabalho, em que o meio SNS 25% produziu os conídios mais virulentos e mais tolerantes à radiação UV, em comparação com o meio BDA.

Na produção comercial de fungos entomopatogênicos, além do baixo custo e alta produtividade de propágulos, a eficiência do controle requer conhecimentos sobre a biologia dos microrganismos, suas necessidades nutricionais e suas respostas aos fatores físicos (PIATKOWSKI; KRZYZEWSKA, 2007). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que um dos fatores que interfere na tolerância do fungo a radiação UV é a condição nutricional oferecida durante seu cultivo. Para incrementar a tolerância, além da manipulação nutricional do meio de cultivo, é necessário selecionar isolados mais tolerantes e utilizar fotoprotetores nas formulações fúngicas.

Composição Química dos Conídios e Correlação com a Qualidade do Fungo

O método de análise química de tecido vegetal foi adequado para determinar a composição química dos conídios de *B. bassiana* e possivelmente possa ser utilizado para outras espécies de fungos entomopatogênicos. Após uma vasta revisão de literatura sobre a composição química de propágulos fúngicos, possivelmente este seja o primeiro trabalho que determinou os teores de 11 elementos químicos de conídios de *B. bassiana* produzidos em diferentes substratos. A maioria dos trabalhos avalia apenas a relação C:N dos conídios (GAO; LIU, 2010; SAFAVI et al., 2007; SHAH et al., 2005).

A composição química variou em função dos substratos (meios de cultivo ou insetos) em que os conídios foram produzidos. Os provenientes de MAD 10% apresentaram composição química diferente dos conídios produzidos sobre os insetos da mesma espécie. Os teores de N, P, K, S, C e relação C:N foram maiores nos conídios produzidos *in vivo*. Já os teores de Cu, Zn e Mn foram maiores nos conídios produzidos em MAD 10%. Em comparação com os outros substratos, os conídios de MAD 10% apresentaram o maior teor de Cu e os menores teores de K, C e relação C:N (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Composição química de conídios de *Beauveria bassiana* (isolado Unioeste 4) produzidos em diferentes meios de cultivos e em insetos.

Origem dos conídios		N ¹		P		K		Ca		Mg		Cu		Zn		Mn		Fe		S		C		C:N	
		g kg ⁻¹										mg kg ⁻¹				g kg ⁻¹		%							
Meio de Cultivo	MAD 10%	61,56	e	14,31	b	2,00	d	0,03	b	0,84	cd	42,55	a	396,05	b	12,10	b	175,60	d	1,84	bc	22,22	e	3,61	d
	SNS 25%	56,91	f	11,88	cd	4,50	c	0,15	b	0,78	d	10,50	d	294,90	c	10,00	c	359,80	b	1,27	d	25,31	d	4,45	c
	SNH 25%	84,50	b	16,93	a	5,00	c	1,12	a	1,69	a	5,55	e	308,45	c	92,80	a	1187,50	a	2,07	abc	38,58	ab	4,57	c
	BDA	53,78	g	10,84	d	8,50	b	0,09	b	1,10	b	18,50	c	443,30	a	9,20	c	276,40	c	2,16	ab	39,48	a	7,34	a
	MPE	68,54	d	13,34	bc	9,00	b	0,14	b	0,94	c	5,10	e	110,70	d	6,25	d	57,55	e	1,79	c	31,43	c	4,59	c
Inseto	<i>A. diaperinus</i>	86,52	a	17,58	a	9,50	b	0,10	b	0,92	c	28,40	b	290,25	c	8,60	c	184,10	d	2,28	a	37,20	b	4,30	c
	<i>D. saccharalis</i>	73,45	c	13,53	bc	12,50	a	0,22	b	1,09	b	10,30	d	137,75	d	9,35	c	65,80	e	1,28	d	37,71	b	5,13	b
CV (%)		0,50		4,99		5,19		35,07		3,71		5,27		3,93		3,41		4,42		6,64		1,86		2,29	

¹Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); MAD (meio de *Alphitobius diaperinus* a 10%); SNS e SNH (meios a base das soluções nutritivas de Sarruge e de Hewitt modificadas, respectivamente, a 25%); BDA (batata, dextrose, ágar) e MEP (meio para produção de esporo de *Beauveria* spp).

Os conídios produzidos sobre *A. diaperinus* e *D. saccharalis*, apresentaram composição muito diferente para a maioria dos elementos. Os teores de N, P, Cu, Zn, Fe e S, foram maiores para os conídios de *A. diaperinus*, enquanto que os teores de K, Mg e a relação C:N foram maior para os conídios produzidos em *D. saccharalis*. Os teores de Ca, Mn e C não diferiram entre as espécies (Tabela 4.2).

Os conídios produzidos em SNH 25% apresentaram teores elevados de P, Ca, Mg, Mn e Fe, que provavelmente são decorrentes da adição de fosfato de sódio, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, Fe EDTA, respectivamente. O fósforo é um elemento indispensável para a síntese de importantes componentes celulares (CARLILE; WATKINSON, 1994). Outro elemento com teor elevado foi o enxofre, provavelmente decorrente da adição dos sulfatos de cobre, zinco, magnésio e manganês. O teor de enxofre também foi elevado nos conídios produzidos em BDA e sobre o *D. saccharalis*. Comparando apenas a composição dos conídios produzidos em meio de cultivo, os provenientes de SNH 25% também apresentaram um elevado teor de N, que pode ser devido à adição dos nitratos de potássio e cálcio.

Os meios BDA e MPE foram os que apresentaram a maior diferença em relação ao teor de Zn nos conídios, que foi aproximadamente quatro vezes maior para os produzidos em BDA. Esse elemento também foi encontrado em quantidades elevadas nos conídios do meio MAD 10%. O meio MPE deu origem a conídios com baixos teores de Cu, Zn, Mn e Fe (Tabela 4.2).

A maior relação C:N foi observada para os conídios produzidos em BDA, que foi cerca de duas vezes maior que a relação C:N dos conídios obtidos no meio MAD 10%. Os demais conídios apresentaram relações C:N intermediárias. A relação C:N de 7,34 para os conídios produzidos em BDA foi próxima a observada por Shah et al. (2005) para conídios de *M. anisopliae* produzidos no mesmo meio, que foi de 7,1. Esses autores verificaram uma correlação positiva entre a relação C:N do meio e endógena dos conídios. Esse mesmo comportamento também foi observado por Safavi et al. (2007) para conídios de *B. bassiana*.

Pelo coeficiente de correlação de Pearson, a produção de conídios apresentou uma correlação positiva com a tolerância dos conídios à radiação UV. Para o isolado Unioeste 4 o meio SNS 25% proporcionou maior produção de conídios, os quais foram mais tolerantes à radiação. Já o meio BDA, no qual esse isolado foi pouco produtivo, os conídios foram mais sensíveis. Não houve correlação entre a produção de conídios e teores de nenhum dos elementos endógenos determinados nos conídios, entretanto, o meio de cultivo

teve alta influência na produção. Esses resultados mostram uma interação complexa entre os nutrientes disponíveis no meio de cultivo e a produção, que pode ter interferência de outros fatores, como por exemplo, o período de incubação (Tabela 4.3).

A tolerância à radiação UV foi a mais influenciada pela composição química dos conídios, com correlações positivas quanto aos teores de K, C, e relação C:N, a qual foi considerada forte, mas com o P a correlação foi negativa. Os conídios produzidos em BDA, que foram mais tolerantes à UV, apresentaram um dos maiores teores de K e C, a maior relação C:N e menor teor de P, ao contrário dos conídios produzidos em MAD 10%, que foram menos tolerantes, tiveram os menores teores de K, C e C:N, e a maior concentração de fósforo.

O enxofre foi prejudicial à virulência, à tolerância à radiação UV e principalmente à produção, com a qual houve uma correlação negativa e forte. Os conídios com os menores teores de S foram produzidos sobre o meio SNS 25%, e esses estavam entre os mais tolerantes à radiação UV, apresentaram alta produção e foram mais virulentos. Já os produzidos em BDA, com maior teor de enxofre, estavam entre os menos virulentos, tolerantes à UV e produtivos (Tabela 4.3).

Shah et al. (2005) associaram a alta virulência com a baixa relação C:N (cerca de 5,2) endógena nos conídios. Esses autores recomendaram que esta relação, associada à taxa de germinação e aos níveis de Pr1, fosse utilizada como um indicador da qualidade dos conídios para prever a virulência do inóculo. Porém, nos resultados obtidos no presente trabalho, a correlação entre relação C:N e virulência não foi significativa, pois a virulência, apesar de influenciada pelas condições nutricionais do meio, pode ser dependente de uma interação complexa entre os nutrientes disponíveis ou dos absorvidos pelos conídios.

As correlações positivas e fortes entre os elementos foram para N e P, N e Ca, N e Mn, P e Mn, Ca e Mg, Ca e Mn, Ca e Fe, Mg e Mn, Mg e Fe, Mn e Fe. E as correlações negativas foram entre P e relação C:N, Cu e K, C e Cu. Estas correlações podem estar associadas à disponibilidade desses elementos no meio de cultivo (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis produção de conídios (14 dias), tolerância à radiação UV (3 mim. de exposição), tolerância à temperatura (20 dias de exposição), virulência (mortalidade confirmada) e teor endógeno dos elementos químicos nos conídios de *Beauveria bassiana*.

	Produção	Virul.	Temp.	UV	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Mn	Fe	S	C
Produção	-	0,6753**	-0,1982 ^{ns}	0,6177*	-0,1878 ^{ns}	-0,2089 ^{ns}	-0,0801 ^{ns}	-0,1602 ^{ns}	-0,3965 ^{ns}	-0,3672 ^{ns}	-0,4035 ^{ns}	-0,2316 ^{ns}	-0,1335 ^{ns}	-0,8362**	-0,4319 ^{ns}
Virul.	-	-	-0,2627 ^{ns}	0,4581 ^{ns}	0,1892 ^{ns}	0,2083 ^{ns}	-0,3123 ^{ns}	0,2446 ^{ns}	0,0227 ^{ns}	-0,2504 ^{ns}	-0,1859 ^{ns}	0,2269 ^{ns}	0,2976 ^{ns}	-0,5158*	-0,2482 ^{ns}
Temp.	-	-	-	-0,4072 ^{ns}	-0,4985 ^{ns}	-0,63236*	0,55879*	-0,2103 ^{ns}	0,0582 ^{ns}	-0,0906 ^{ns}	0,4888 ^{ns}	-0,2259 ^{ns}	-0,1139 ^{ns}	0,4089 ^{ns}	0,5981*
UV	-	-	-	-	0,1271 ^{ns}	0,03608 ^{ns}	-0,2066 ^{ns}	0,2255 ^{ns}	-0,0543 ^{ns}	-0,4419 ^{ns}	-0,3128 ^{ns}	0,1648 ^{ns}	0,2660 ^{ns}	-0,6849**	-0,2377 ^{ns}
N	-	-	-	-	-	0,91377**	-0,0769 ^{ns}	0,8894**	0,7998**	-0,4178 ^{ns}	-0,3858 ^{ns}	0,8758**	0,7591**	0,3063 ^{ns}	0,3445 ^{ns}
P	-	-	-	-	-	-	-0,4078 ^{ns}	0,7832**	0,6809**	-0,0673 ^{ns}	-0,1819 ^{ns}	0,8213**	0,6943**	0,2752 ^{ns}	0,0747 ^{ns}
K	-	-	-	-	-	-	-	-0,0928 ^{ns}	0,1010 ^{ns}	-0,6199*	-0,3879 ^{ns}	-0,2007 ^{ns}	-0,2174 ^{ns}	0,3019 ^{ns}	0,6531**
Ca	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9294**	-0,4813 ^{ns}	-0,0782 ^{ns}	0,9858**	0,9614**	0,3394 ^{ns}	0,5353*
Mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,4148 ^{ns}	0,0760 ^{ns}	0,9312**	0,8936**	0,6371*	0,7529**
Cu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6148*	-0,3465 ^{ns}	-0,3784 ^{ns}	0,1021 ^{ns}	-0,5509*
Zn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0343 ^{ns}	0,1391 ^{ns}	0,3522 ^{ns}	0,0919 ^{ns}
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9724**	0,3827 ^{ns}	0,4912 ^{ns}
Fe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2868 ^{ns}	0,5019 ^{ns}
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7057**
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C:N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Correlações significativas a 1%; ** significativas a 5%; ^{ns} não significativas;

4.4 CONCLUSÕES

Os meios de cultivo desenvolvidos neste trabalho, MAD 10%, SNS 25% e SNH 25%, favorecem um aumento da produtividade de conídios, e esta característica está intimamente relacionada com o perfil de cada isolado. Dos meios desenvolvidos, o SNS 25% pode ser considerado um dos melhores, pois além da alta produção de conídios induz a maior tolerância à radiação UV.

As condições nutricionais de cultivo influenciam a produção de conídios, a virulência e a tolerância à radiação UV e temperatura. Os meios que favorecem alta produção de conídios dão origem aos mais tolerantes à radiação UV e mais virulentos.

A tolerância à temperatura é positivamente correlacionada com os teores de K, C e principalmente com a relação C:N endógena nos conídios. Entretanto elevados teores de P são prejudiciais. O aumento do teor de enxofre nos conídios também influencia de maneira negativa a produção de conídios, a virulência e a tolerância à radiação UV.

Os teores dos elementos químicos endógenos nos conídios são influenciados pelo substrato em que o fungo é produzido e estão correlacionados com a qualidade do propágulo produzido.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.637-712.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-382.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.97-170.

ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MARQUES, E.J. Produção de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.215-238.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.845-870.

- AZEVEDO, A.C.S.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMES, D.R.; FUNGARO, M.H.P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, p.729-732, 2000.
- BARBOSA, C.C.; MONTEIRO, A.C.; CORREIA, A.C.B.; PEREIRA, G.T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.821-829, 2002.
- BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, New York, v.94, p.912-920, 2002.
- BUTT, T.M.; COPPING, L.G. Fungal biological control agents. **Pesticide outlook**, v.11, p.186-191, 2000.
- CAIXETA, M.P.; CORAZZA, M.J.; OLIVEIRA, R.R.; ZANUTTO, C.A.; NUNES, W.M.C.; VIDA, J.B. Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolados de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.30, p.625-630, 2008.
- CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. **The fungi**. London: Academic Press, 1994. 482p.
- CHELICO, L.C.; HAUGHIAN, J.L.; WOYTOWICH, A.E.; HACHATOURIANS, G.G. Quantification of ultraviolet-C irradiation induced cyclobutane pyrimidine dimers and their removal in *Beauveria bassiana* conidiospore DNA. **Mycologia**, New York, v.97, p.621-627, 2005.
- CRECY, E. de; JARONSKI, S.; BENJAMIN, L.; LYONS, T.J.; NEMAT, O.K. Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. **BMC Biotechnology**, v.9, p.1-11, 2009.
- DAMIR, M. El. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium Anisopliae*. **Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.6, p.269-274, 2006.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: Lewis Publisher, 1995.
- ENGELKES, C.A.; NUCLO, R.L.; FRAVEL, D.R. Effect of carbon, nitrogen, and carbon to nitrogen ratio on growth, sporulation and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, p.500-505, 1997.
- FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v.135, p.171-181, 1996.

FENG, M.G.; PROPAWSKI, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.1, p.3-34, 1994.

GAO, L.; LIU, X. Effects of carbon concentrations and carbon to nitrogen ratios on sporulation of two biological control fungi as determined by different culture methods. **Mycopathologia**, Den Haag, v.169, p.475-481, 2010.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. **Fungal nutrition and physiology**. New York: J. Wiley, 1984. 401p.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology**, Washington, v.141, p.1109-1115, 1995.

HASSAN, A.E.M.; CHARNLEY, A.K. Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin affected cuticle of *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.54, p.117-124, 1989.

HEINRICH, B. Insect thermoregulation. **Endeavour**, Oxford, v.19, p.28-33, 1995.

HEWITT, E.J. Composition and preparation of nutrient solution. In: HEWITT, E.J. **Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition**. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1952. p.187-191.

HUMBER, R.A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.98, p.262-266, 2008.

JABOR, I.A.S.; PAMPHILE, J.A.; RODRIGUES, S.B.; MARQUES-SILVA, G.G.; ROCHA, C.L.M.S.C.da. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.25, p.497-501, 2003.

KAMP, A.M.; BIDOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.74-77, 2002.

KHACHATOURIANS, G.G.; VALENCIA, E.; MIRANPURI, G.S. *Beauveria bassiana* and other entomopathogenic fungi in the management of insect pests. In: KOUL, O.; DHALIWAL, G.S. (Ed.) **Microbial biopesticides**. v.2. 2. ed. Taylor e Francis: London, 2002. p.239-275.

KIM, J.S.; JE, Y.H.; ROH, J.Y. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. **Journal of industrial microbiology e biotechnology**, Hampshire, v.37, p.419-423, 2010.

KRASNIEWSKI, I.; MOLIMARD, P.; FERON, G.; VERGOIGNAN, C.; DURAND, A.; CAVIN, J.F.; COTTON, P. Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti*. **Process Biochemistry**, London, v.41, p.1318-1324, 2006.

LACAZ, C. da S.; MINAMI, P.S.; PURCHIO, A. **O grande mundo dos fungos**. São Paulo: Editora Polígono/Edusp, 1970. 2255p.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto, 2003. 92p.

LENG, Y.; PENG, G.; CAO, Y.; XIA, Y. Genetically altering the expression of neutral trehalase gene affects conidiospore thermotolerance of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **BMC Microbiology**, London, v.11, p.1-8, 2011.

LOUREIRO, E. de S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.de; PESSOA, L.G.A. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.72, p.469-472, 2005.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; MURAOKA, T.; CARMO, C.A.F.S. do; MELO, W.J. de. Análise química de tecido vegetal. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília:Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p.191-234.

MONTEIRO, A.C.; BARBOSA, C.C.; CORREIA, A. do C.B. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lenacii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.561-565, 2004.

MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.122, p.605-616, 1993.

MUSTAFA, U.; KAUR, G. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. **African Journal of Agricultural Research**, v.4, p.922-930, 2009.

NASCIMENTO, E.; SILVA, S.H da, MARQUES, E. dos R.; ROBERTS, D.W.; BRAGA, G.U.L. Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.20, p.1-8, 2010.

OTTATI-de-LIMA, E.L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; GASSEN, M.H; WENZEL, I.M.; ALMEIDA, A.M.B.de; ZAPPELLINI, L.O. Produção semi-sólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, p.651-659, 2010.

OUEDRAOGO, A.; FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; LOMER, C.J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Mycopathologia**, Den Haag, v.137, p.37-43, 1997.

PIATKOWSKI, J.; KRZYZEWSKA, A. Influence of some physical factors on the growth and sporulation of entomopathogenic fungi. **Acta Mycologica**, Warszawa, v.42, p.255-265, 2007.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, D.W.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v.5, p.141-238, 1953.

POSADA-FLÓREZ, F.J. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. **Journal of Insect Science**, Madison, v.8, p.1-13, 2008.

QUADROS, D.A. de; IUNG, M.C.; FERREIRA, S.M.R.; FREITAS, R.J.S. de. Composição química de tubérculos de batata para processamento, cultivados sob diferentes doses e fontes de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, p.316-323, 2009.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.87, p.77-83, 2004.

RODRÍGUEZ-GÓMES, D.; LOERA, O.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.25, p.513-518, 2009.

ROHLF, F.J. NTSYS-PC: micro-computer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. **American Statistician**, Washington, v.41, p.330, 1987.

ROY, HE.; STEINKRAUS, D.C.; EILENBERG, J.; HAJEK, A.E.; PELL, J.K. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.51, p.331-357, 2006.

SAFAVI, S.A.; SHAH, F.A.; PAKDEL, A.K.; RASOULIAN, G.R.; BANDANI, A.R.; BUTT, T.M. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.270, p.116-123, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 88p.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesquisa Agropecária Brasileira**, Brasília, v.40, p.483-489, 2007.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.1, p.231-233, 1975.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.251, p.259-266, 2005.

SILVA, F.C.; ABREU, M.F. de; PÉREZ, D.V.; EIRA, P.A. da; ABREU, C.A.de; RAIJ, B.; GIANELLO, C.; COELHO, A.M.; QUAGGIO, J.A.; TEDESCO, M.J.; SILVA, C.A.; CANTARELA, H; BARRETO, W. de O. Métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo. In: SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p.107-190.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Âmbito cultural, 1995. 336p.

SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. **Molecular Cell**, Cambridge, v.1, p.639-648, 1998.

SMITH, R.J.; GRULA, E.A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.37, p.222-230, 1981.

THOMAS, K.C.; KHACHATOURIANS, G.G.; INGLEDEW, W.M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, p.12-20, 1987.

VERKERK, M.C.; TRAMPER, J.; TRIJP, J.C.M. van; MARTENS, D.E. Insect cells for human food. **Biotechnology Advances**, New York, v.25, p.198-202, 2007.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LANCEY, L.A.; JACKSON, M.A. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycopathologia**, Den Haag, v.143, p.33-46, 1998.

YING, S.H; FENG, M.G. Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidia of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.43, p.331-335, 2006.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.40, p.36-40, 1982.

5 ARTIGO B: EFEITO DE CULTIVOS SUCESSIVOS *IN VITRO* DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. NA QUALIDADE DOS CONÍDIOS

Resumo

Os cultivos sucessivos *in vitro* podem afetar a qualidade e a estabilidade dos fungos entomopatogênicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de cultivos sucessivos *in vitro* de *Beauveria bassiana* em diferentes condições nutricionais sobre crescimento vegetativo, produção de conídios, virulência e tolerância à temperatura e à radiação UV. Foram utilizados o meio BDA e um meio constituído de insetos (MAD). O fungo foi inicialmente passado pelo hospedeiro, cultivado por 17 vezes nos diferentes meios, e novamente passado pelo inseto. Os cultivos sucessivos e as condições nutricionais do meio afetaram a qualidade do fungo. A atenuação do crescimento vegetativo e da produção de conídios foi menos acentuada após os cultivos em MAD, que favoreceu a manutenção destas características por um número maior de cultivos. Esse meio favoreceu a manutenção da virulência após 17 cultivos, enquanto que em BDA ocorreu redução. Os conídios produzidos em BDA mantiveram a tolerância à temperatura inalterada após os cultivos. *B. bassiana* foi suscetível à radiação UV, porém esta característica não foi afetada pelos cultivos sucessivos *in vitro* nos diferentes meios. A virulência, a produção de conídios e a tolerância à temperatura, que foram atenuadas pelos cultivos *in vitro*, puderam ser restauradas após a passagem do fungo pelo hospedeiro.

Palavras-chave: *Alphitobius diaperinus*. Controle biológico. Fatores abióticos. Fungos entomopatogênicos. Passagem *in vitro*. Produção de conídios. Radiação UV. Temperatura.

EFFECTS OF SUCCESSIVE SUBCULTURING OF *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. *IN VITRO* IN CONIDIAL QUALITY

Abstract

Successive subculturing *in vitro* can affect the entomopathogenic fungi quality and stability. The aim of this study was to evaluate the effect of successive subculturing of *B. bassiana in vitro* under different nutritional conditions on vegetative growth, conidial yield, virulence and tolerance to temperature, and UV radiation. We used BDA and a medium made of insects (MAD). The fungus was initially subcultured successively by 17 times in these media, and subcultured again in the insect. Successive subculturing and nutritional conditions of the media affected fungus quality/stability. The vegetative growth declined and conidial yield was lower after subculture in MAD medium, which favored the maintenance of these characteristics for many successive subcultures. This medium favored the maintenance of virulence after 17 successive subcultures, while a reduction was observed in BDA. Conidia produced in BDA maintained temperature tolerance unchanged after subcultures. *B. bassiana* was sensible to UV radiation, but this characteristic was not affected by successive subcultures *in vitro* in different media. The virulence, conidial yield and temperature

tolerance, which declined during *in vitro* successive subcultures, could be restored after the fungus subculture in the host.

Keywords: Abiotic factors. *Alphitobius diaperinus*. Biological control. Chemical Analysis. Entomopathogenic fungi. *In vitro* passage. Conidial yield. UV radiation. Temperature.

5.1 INTRODUÇÃO

Os fungos foram os primeiros patógenos utilizados no controle microbiano (ALVES, 1998) e são promissores devido à capacidade de supressão das populações de insetos e ácaros. Tem um amplo espectro de hospedeiros, possibilidade de cultivo *in vitro* e de formulação (LEITE et al., 2003). Na produção massal, a manutenção das características produtivas e da virulência são essenciais para assegurar a qualidade do fungo e sua eficiência no campo. A produção em meio sólido, líquido e bifásico, descritos por Leite et al. (2003), iniciam-se com a multiplicação dos conídios em meio BDA. Esses conídios são posteriormente utilizados para a produção de matrizes sólidas ou líquidas. Nesse processo, os cultivos sucessivos *in vitro* podem afetar a qualidade do propágulo produzido.

Na Colômbia, produção de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em arroz é feita pelos agricultores, e para se restabelecer a virulência após vários cultivos é recomendado que o fungo seja periodicamente revigorado pela passagem no inseto alvo (ALVES et al., 2008). A redução da virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) a *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae) e redução da produção da enzima Pr1 foram observadas após cultivos sucessivos em meio SDA (sabouraud, dextrose, ágar) (SHAH et al., 2007). Quesada-Moraga e Vey (2003) acreditam que a redução ou incremento da virulência pode estar relacionado a fatores nutricionais no cultivo. Esses autores observaram que conídios de *B. bassiana* apresentaram redução na virulência a *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) após dois cultivos em meio SDA, e incremento após dois cultivos em meio MA (malte, ágar) ou após duas passagens pelo hospedeiro. Ao adicionar insetos mortos no meio SDA, houve um aumento da virulência de *B. bassiana* a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) e esta característica se manteve após 15 cultivos nesse meio (GARCIA et al., 2001).

Para isolados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise), a virulência a *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Hemiptera: Aphididae) e *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) não foi afetada após 30 cultivos consecutivos em meio SDY

(sabouraud, dextrose, extrato de levedura). Entretanto, para alguns dos isolados foi observada redução na produção e viabilidade dos conídios (VANDENBERG; CANTONE, 2004). Não foram observadas alterações morfológicas nos conídios de *B. bassiana* e nem redução de virulência à *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae; = *Bemisia argentifolii* Bellows e Perring) após 15 passagens sucessivas em SDY, concluindo que o isolado apresenta características estáveis para a produção massal (BROWNBRIDGE et al., 2001).

Os resultados divergentes obtidos nos estudos sobre as características dos fungos entomopatogênicos após cultivos sucessivos podem estar relacionados às variações inter e intraespecíficas, ao uso de culturas monospóricas ou multiespóricas e ao cultivo em diferentes condições nutricionais, pois os eventos que levam a atenuação da virulência podem ser aleatórios (mutação) ou estão relacionados às condições de cultivo (BROWNBRIDGE et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de cultivos sucessivos *in vitro* de *B. bassiana* no meio BDA e em meio constituído de insetos (MAD), sobre o crescimento vegetativo, a produção de conídios, a virulência e a tolerância à temperatura e à radiação UV.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Meios de Cultivo

As passagens sucessivas do fungo foram realizadas em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD, meio constituído por adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) adultos, que foram coletados em aviários em Londrina, PR. Os insetos foram mortos por congelamento, desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 2%, lavados em água destilada e triturados em liquidificador com água destilada, na concentração 10% (p/v). O pH dos meios foi corrigido para 7 com solução de NaOH (1N), solidificados com ágar (20g l⁻¹), esterilizados em autoclave por 30 min. e vertidos em placas de Petri (5,2 cm Ø) esterilizadas.

Multiplicação do Inóculo de *B. bassiana* e Cultivos Sucessivos *in vitro*

Utilizou-se o isolado Unioeste 4 multiespórico de *B. bassiana*, virulento a *A. diaperinus* (ROHDE et al., 2006; SANTORO et al., 2008), que está armazenado na Coleção

de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Estadual de Londrina. A multiplicação inicial dos conídios se deu em placas com meio para a produção de esporo de *Beauveria* spp. (MPE) (ALVES et al., 1998), que foram incubadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h) por 10 dias. Os conídios produzidos sobre o meio foram inoculados em adultos de *A. diaperinus* previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 2% e lavados em água destilada. A inoculação se deu por submersão dos insetos em uma suspensão com $1,0\times 10^7$ conídios ml^{-1} por 15 s. Após a morte, os insetos foram novamente desinfetados e acondicionados em câmara úmida ($25\pm 1^\circ\text{C}$) por 5 dias.

O fungo produzido sobre os insetos mortos (1°-inseto) foi multiplicado nos meios BDA e MAD, como descrito anteriormente, dando origem aos conídios de primeiro cultivo 1°(1). Esses foram novamente multiplicados nos respectivos meios, dando origem aos de 2° cultivo, e assim sucessivamente até o 17° cultivo. Esses conídios (17°) foram novamente inoculados em *A. diaperinus*. Após a morte, o fungo produzido sobre esses insetos (2°-inseto) foi multiplicado nos meios de origem, produzindo novamente conídios de primeiro cultivo 1°(2).

A cada cultivo, os conídios produzidos *in vivo* e *in vitro* foram recolhidos em tubos esterilizados e armazenados a -6°C . Devido ao tempo gasto para se obter todos os cultivos (aproximadamente 200 dias), foi necessário padronizar a idade dos conídios para eliminar alguma interferência decorrente do tempo de armazenagem. Para isso, os conídios armazenados a -6°C , produzidos em 1°-inseto, 3°, 7°, 11°, 16°, e 2°-inseto, foram novamente multiplicados em seus respectivos meios (BDA ou MAD), dando origem aos conídios de 1°(1), 4°, 8°, 12°, 17° e 1°(2) cultivo, respectivamente. Para cada um desses cultivos foram feitas 25 placas de cada meio, que foram utilizadas nos bioensaios.

Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios

O meio utilizado para avaliar o crescimento vegetativo e produção de conídios foi o MPE vertido em placas de Petri (9 cm Ø). O fungo foi repicado em um ponto central da placa com uma alça de platina pontiaguda, a fim de se obter apenas uma colônia. As placas foram incubadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h) por 10 dias. O crescimento vegetativo foi determinado pelo cálculo da área da colônia, feito com a média de dois diâmetros opostos. Das mesmas colônias avaliou-se a produção de conídios, que foram removidos do meio com o auxílio de uma espátula e recolhidos em um tubo. Os conídios foram suspensos em solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v) e submetidos à agitação em

vortex por 30 segundos. Após as diluições necessárias, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Considerou-se como produção o número total de conídios da colônia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2×6) (meios de origem do conídios × cultivos), com quatro repetições.

Produção de Conídios em Arroz

Em 1L de água destilada em ponto de ebulição foram adicionadas 500g de arroz parboilizado, que foi cozido por três minutos no aparelho microondas em potência máxima. O tempo de cozimento foi suficiente para que os grãos atingissem uma consistência “emborrachada”. A água não absorvida pelo arroz foi escoada em peneira e 65 g do arroz foram colocadas em garrafas de vidro (500ml). Estas foram tampadas com papel toalha que foi preso ao gargalo por um elástico e esterilizadas em autoclave por 30 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, cada garrafa foi inoculada com 1,5 ml de uma suspensão com $1,0 \times 10^7$ conídios ml^{-1} . As garrafas foram incubadas câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h) por 15 dias. Para avaliar a produção de conídios, foram adicionados 300 ml de uma solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v) em cada garrafa. Estas foram submetidas à agitação manual por três minutos e após as diluições necessárias, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2×6) (meios de origem do conídios × cultivos), com cinco repetições.

Virulência a *Alphitobius diaperinus*

Em placa de acrílico (6 cm Ø) foram colocados 50 insetos adultos de *A. diaperinus*. Esses foram pulverizados (pulverizador Airbrush acoplado a um compressor/aspirador Fanem-DiaPump) com 0,5 ml de uma suspensão de 8×10^6 conídios ml^{-1} , que corresponde a CL_{50} do isolado Unioeste 4, estimada para a praga por esse método (SANTORO et al., 2007). A testemunha foi pulverizada com solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v), utilizada como veículo da suspensão do fungo. Os insetos foram alimentados com ração de milho esterilizada e mantidos em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h). A avaliação foi realizada ao 10º dia, quando os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por mais cinco dias, para confirmar a mortalidade pelo patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial

(2×6)+1 (meios de origem do conídios × cultivos) + testemunha, com seis repetições de 50 insetos.

Tolerância à Radiação UV

Sobre a superfície do meio MPE foi espalhado, com alça de Drigalski, 0,1 ml de uma suspensão com 1×10^3 conídios ml^{-1} . As placas sem tampa foram colocadas em câmara de fluxo laminar, sob lâmpada germicida (253,7 nm, Philips TUV, baixa pressão 30W) a uma distancia de 52 cm. Após o período de exposição à radiação UV por um minuto, as placas foram fechadas com as tampas e transferidas para câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h). O número de colônias formadas foi avaliado após cinco dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2×6) (meios de origem do conídios × cultivos) com quatro repetições.

Tolerância à Temperatura

Os conídios provenientes dos cultivos sucessivos foram armazenados em tubos de ensaio esterilizados e acondicionados em câmara climatizada a 30°C por 0 e 15 dias, no escuro. A tolerância dos conídios à temperatura foi avaliada por UFC, como descrito no experimento anterior. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2×6) (meios de origem dos conídios × cultivo), com cinco repetições.

Análises Estatísticas

Os dados dos tratamentos com delineamento inteiramente casualizado e inteiramente casualizado em esquema fatorial, foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A comparação entre as médias do fatorial com a testemunha foi feita pelo teste Dunnett ($p < 0,05$).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

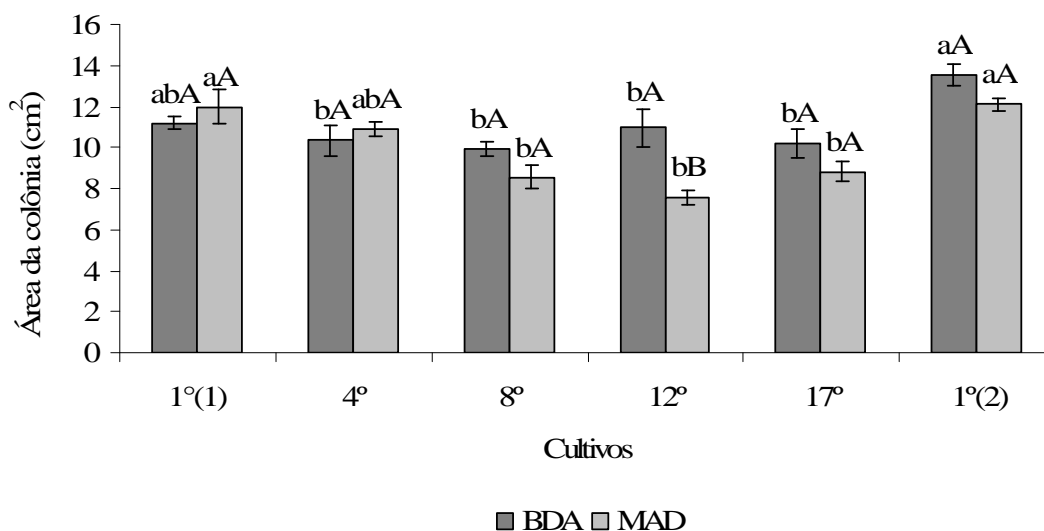
Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios

O crescimento vegetativo foi afetado pelos cultivos sucessivos em diferentes meios. Para os conídios provenientes de BDA, não houve diferença do 1º(1) ao 17º cultivo. Após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro, no cultivo 1º(2), o crescimento vegetativo não diferiu de 1º(1), no entanto foi superior aos demais. Para os conídios produzidos em MAD não houve redução do 1º(1) ao 4º cultivo. No 8º, 12º e 17º houve redução quando comparados ao 1º(1). Também, houve recuperação do crescimento vegetativo no cultivo 1º(2) para os conídios produzidos em MAD. Na comparação entre os meios, apenas no 12º cultivo houve diferença, com maior crescimento para os conídios provenientes de BDA (Figura 5.1).

É comum a redução do crescimento vegetativo dos fungos entomopatogênicos após os cultivos sucessivos *in vitro*. Alguns isolados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) apresentaram redução na produção de micélio em meio líquido e de conídios em meio sólido após 30 cultivos em meio SDA (VANDENBERG; CATONE, 2004). Para *Verticillium lecanii* (Zimmerman) foram observadas alterações morfológicas e redução do crescimento após 98 cultivos *in vitro* (HALL, 1980).

A maioria dos estudos sobre o efeito de cultivos sucessivos *in vitro* tem avaliado apenas a virulência do patógeno ao hospedeiro (BARBOSA et al., 1985; BROWNBRIDGE et al., 2001; IGNOFFO et al., 1982; SHAH et al., 2007). Porém, o sucesso do controle biológico pelos fungos entomopatogênicos é dependente de vários fatores, entre eles capacidade de produzir altas concentrações de propágulos infectivos *in vitro*. Segundo Alves e Pereira (1998), para que os fungos sejam eficientes, independentemente da densidade populacional dos insetos, é necessário que exista um elevado potencial de inóculo na área, o que se consegue por meio de aplicações inundativas no campo. Por esse motivo, o estudo dos efeitos de cultivos sucessivos *in vitro* na produção de conídios é de fundamental importância.

Figura 5.1 – Crescimento vegetativo (cm^2) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($\text{CV} = 11,01\%$); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

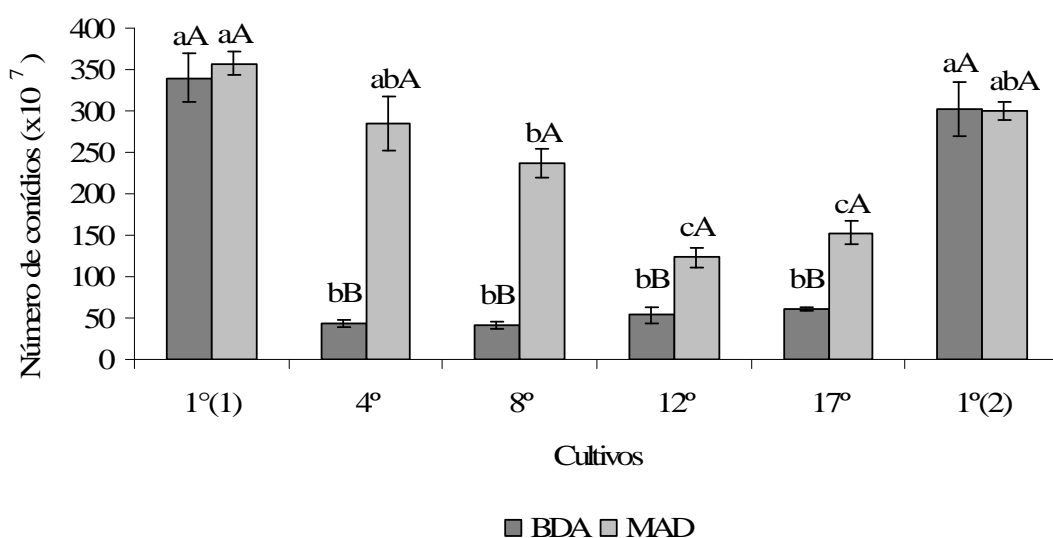


Apesar de não haver diferença no crescimento vegetativo para os conídios provenientes de BDA do 1º(1) ao 17º cultivo, a produção de conídios apresentou uma acentuada redução no 4º cultivo, que se manteve baixa até o 17º. Houve uma recuperação após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro no cultivo 1º(2) em BDA. Para os conídios de MAD ocorreu redução no 8º cultivo quando comparado ao 1º(1). Esta redução foi mais acentuada no 12º e 17º cultivos, que não diferiram entre si. A passagem do fungo pelo hospedeiro restabeleceu a capacidade produtiva de conídios em 1º(2), que não diferiu de 1º(1). Não houve diferença entre BDA e MAD apenas no 1º(1) e 1º(2) cultivo. Nos demais, a produção foi superior em MAD (Figura 5.2).

Os processos de produção em meio sólido, líquido e bifásico, descritos por Leite et al. (2003), normalmente iniciam-se com a multiplicação dos conídios em meio BDA, os quais são posteriormente utilizados para a produção de matrizes sólidas ou líquidas. Por esse motivo é importante saber qual o impacto dos cultivos sucessivos em diferentes condições nutricionais, principalmente em meios comumente utilizados como é o BDA.

Observou-se que o efeito de cultivos sucessivos *in vitro* em relação ao crescimento vegetativo e, principalmente, à produção de conídios, foi extremamente dependente das condições nutricionais do meio. O meio composto por insetos triturados foi mais propício para a manutenção das características reprodutivas de *B. bassiana*, possivelmente por se tratar de uma espécie entomopatogênica.

Figura 5.2 – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios colônia⁻¹) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos no mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=19,30); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Muitos trabalhos abordaram o efeito de diferentes meios de cultivo sobre a produção de conídios (ABRAHAM et al., 2003; DAMIR, 2006; FARGUERS et al., 2002; WENZEL et al., 2006). Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho mostram que as condições nutricionais não afetam o desenvolvimento do fungo apenas no cultivo atual, mas podem influenciar nos cultivos subsequentes. Após os cultivos sucessivos, a condição nutricional para avaliar o crescimento vegetativo e a produção para os conídios provenientes de diferentes meios (BDA e MAD) foi a mesma (MPE), o que comprova que os efeitos do número de cultivos *in vitro* e das condições onde eles ocorreram são consequências de características endógenas aos conídios.

O meio MAD, constituído por insetos triturados, favoreceu a manutenção das características relacionadas ao desenvolvimento e reprodução do fungo após um maior número de cultivos, e a redução da produção de conídios foi menos acentuada que em meio BDA. Além disso, a passagem do fungo pelo hospedeiro fez com que se restabelecessem estas características para os conídios provenientes dos dois meios. Essa informação é importante para o processo de produção em larga escala, pois caso os conídios que dão origem as matrizes não sejam produzidos em meios que preservem as características produtivas, é fundamental realizar a passagem periódica do fungo pelo hospedeiro.

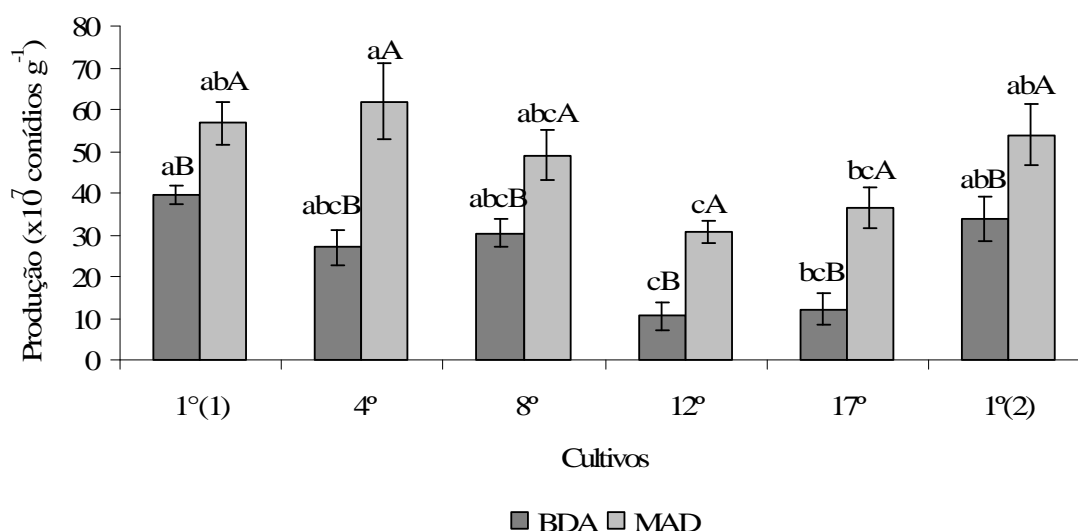
Produção de Conídios em Arroz

A produção de conídios em arroz foi reduzida quando se utilizaram conídios provenientes de cultivos sucessivos *in vitro*. Para os conídios oriundos de BDA, não houve redução entre os de 1º(1), 4º e 8º cultivo. Para os de 12º e 17º, a produção foi menor quando comparados a 1º(1). Após a segunda passagem do fungo pelo inseto, no cultivo 1º(2), houve recuperação da produção, que não diferiu de 1º(1) (Figura 5.3).

Para MAD, não houve diferença quando se utilizaram conídios de 1º(1), 4º e 8º cultivo. Houve redução para os de 12º, quando comparados ao 1º(1) e 4º, e para o 17º quando comparado ao 4º cultivo. Para os oriundos de 1º(2) ocorreu um incremento da produção, que foi superior a observada para 12º. A redução máxima da produção de conídios em arroz, decorrente dos cultivos sucessivos, foi de aproximadamente quatro vezes para BDA, e de duas vezes em MAD. Na comparação entre os meios, a produção para os de MAD foi sempre superior, chegando a ser três vezes maior no 12º e 17º cultivo (Figura 5.3). Os efeitos dos cultivos sucessivos em BDA e MAD foram menos pronunciados na produção em arroz, em comparação à produção em MPE nas placas de Petri.

A capacidade de crescer e produzir conídios *in vitro* para espécies como *B. bassiana* e *M. anisopliae* é uma das principais vantagens de para o desenvolvimento comercial de produtos a base de fungos (BIDOCHKA et al., 2001). No Brasil, os substratos sólidos, em especial grãos de arroz, são os mais utilizados para a produção de fungos entomopatogênicos em larga escala, principalmente devido ao baixo custo (ALVES; PEREIRA 1998, LEITE et al., 2003). Porém, os componentes nutricionais, bem como a quantidade de nutrientes disponíveis, podem ter um profundo efeito sobre o crescimento da cultura, produção de conídios e da virulência desses microrganismos (KAMP; BIDOCHKA 2002).

Figura 5.3 – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* em arroz cozido, inoculado com conídios provenientes de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após 15 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=29,04%); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



A viabilidade da utilização de fungos como agentes de controle biológico é dependente de vários condicionantes biológicos, incluindo a capacidade de produzir altas concentrações de propágulos a um custo razoável (JARONSKI, 1986; LATGÉ et al., 1986). E a estabilidade da capacidade produtiva é uma característica desejável para o desenvolvimento de produtos comerciais à base de fungos (VANDENBERG; CATONE 2004). Independente do meio onde ocorreram os cultivos sucessivos verificou-se que a capacidade produtiva é restaurada após a passagem do fungo pelo hospedeiro. Na produção em larga escala, o controle de qualidade que avalie periodicamente a quantidade de propágulos produzidos é uma ferramenta que possibilita identificar a necessidade de se realizar a passagem do fungo pelo hospedeiro.

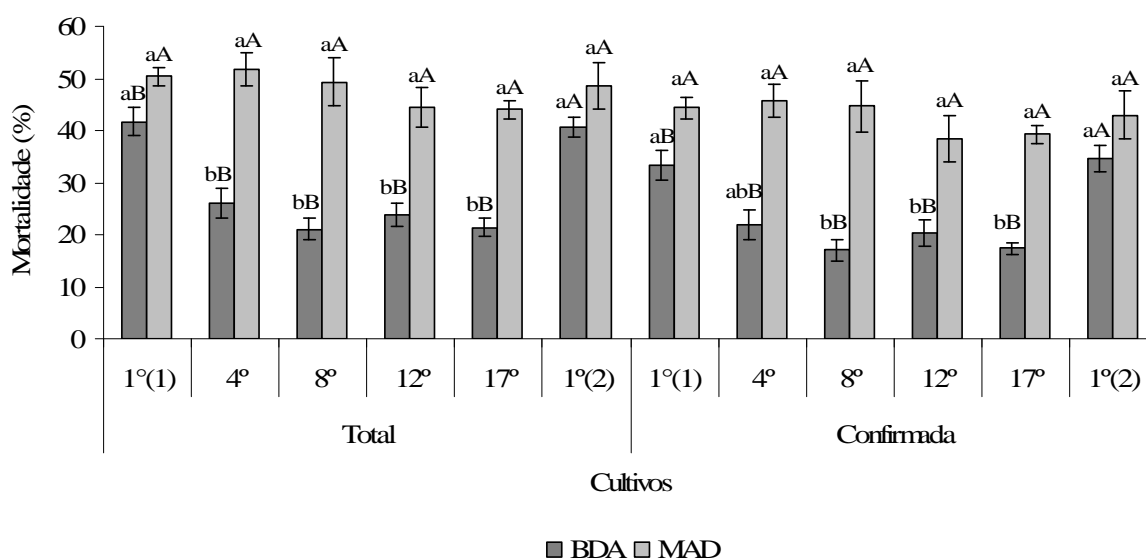
Virulência a *Alphitobius diaperinus*

As condições nutricionais durante os cultivos sucessivos afetaram significativamente a virulência de *B. bassiana* a *A. diaperinus*. Butt e Copping (2000)

ressaltam que é necessário identificar as condições de cultivo que retenham a virulência, sem aumentar os custos de produção. No entanto, pouco progresso tem sido feito nesta área, em parte porque os mecanismos de atenuação da virulência não foram elucidados.

As mortalidades, total e confirmada, nos tratamentos com fungo foram superiores às testemunhas. As diferenças entre os valores da mortalidade total e da confirmada, foram próximas ao valor da testemunha, que foi de 7,33%. Os cultivos sucessivos em BDA reduziram a virulência do fungo para os conídios de 4º cultivo na mortalidade total e de 8º cultivo na confirmada. Não houve diferenças do 4º ao 17º cultivo, com redução máxima próxima a 50%. Contudo, após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro, os conídios produzidos em 1º(2) tiveram a virulência restaurada, e não diferiram de 1º(1) (Figura 5.4).

Figura 5.4 – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*); letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), para mortalidade total (CV=18,52%) e confirmada (CV=22,89%). As mortalidades nas testemunhas, total (7,33%) e confirmada (0%), diferem dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



A atenuação da virulência pode estar relacionada à capacidade de germinação e adesão de conídios à cutícula (ADAMES et al., 2010), que são características

indicadoras de virulência (INGLIS et al., 2001). Neste sentido Shah et al. (2005) mostraram que conídios com maior relação C:N tinham germinação mais lenta e foram menos virulentos. Assim, o meio BDA, rico em carbono devido a presença de dextrose, amido e outros carboidratos presentes na batata, pode ter favorecido a redução mais acentuada da virulência após os cultivos sucessivos.

As mortalidades total e confirmada não foram reduzidas após os cultivos sucessivos em meio MAD, e a passagem do fungo pelo hospedeiro não favoreceu o incremento da virulência. Na comparação entre os meios, as mortalidades total e confirmada foram superiores quando se utilizaram conídios produzidos em meio MAD, exceto para 1^o(2) em que não diferiu de BDA (Figura 5.4). A manutenção da virulência após os cultivos sucessivos em MAD pode estar relacionada aos aspectos nutricionais do meio. Hussain et al. (2010) acreditam que o hospedeiro provê ao fungo uma nutrição adequada para a produção de conídios mais virulentos. Alguns trabalhos mostram que meios contendo cutícula de insetos podem induzir a produção da enzima Pr1 (CAMPOS et al., 2005; GUPTA et al., 1992; ITO et al., 2007; TIAGO et al., 2002). Esta enzima é uma protease que degrada a cutícula do hospedeiro e é um determinante de virulência (SHAH et al., 2005).

O uso de meios naturais complexos pode evitar a seleção de mutantes nutricionais menos patogênicos, comuns quando se utilizam meios artificiais (MARSHALL, 1915 apud PEREIRA; EIRA (1999). Segundo Alves et al. (1998), são denominados meios complexos aqueles com composição mal definida, como arroz, trigo e outros, e meios sintéticos aqueles que tem uma composição química bem determinada. Neste sentido, os meios BDA e MAD podem ser considerados complexos, ou parcialmente complexo no caso de BDA, devido à adição de dextrose. Entretanto, os resultados de virulência obtidos neste trabalho mostram que a relação entre os cultivos sucessivos e a nutrição do fungo é complexa, possivelmente porque a patogenicidade de fungos não é determinada por um único fator, mas depende de uma interação coordenada entre muitos fatores (SHAH et al., 2005).

A passagem do fungo pelo hospedeiro é comumente relatada como uma maneira de se recuperar a virulência que foi atenuada após os cultivos sucessivos *in vitro* (BROWNBRIDGE et al., 2001; GUEDES FRAZZON et al., 2000; HAYDEN et al., 1992; HUSSAIN et al., 2010; VANDENBERG; CANTONE, 2004). O meio de cultivo é um ambiente de reprodução menos restritivo que o hospedeiro, permitindo a multiplicação de mais variantes genéticas do fungo, inclusive as menos virulentas ou as avirulentas. Já a passagem pelo inseto pode reduzir esta diversidade genética, eliminando as variantes não patogênicas. Isso mostra o impacto que o hospedeiro exerce na evolução da população de um

patógeno (SCULLY; BIDOCHKA, 2006). Este pode ser o motivo pelo qual ocorreu a recuperação da virulência após a passagem pelo inseto para os conídios provenientes de cultivos sucessivos em BDA, já que neste trabalho não se utilizou fungo em cultivo monospórico. A manutenção da virulência em MAD sugere que as condições nutricionais desse meio favoreçam a multiplicação dos conídios responsáveis por uma maior virulência, ou que inibam a multiplicação dos menos virulêntos, atuando como um filtro.

Feng et al. (1994) acreditam que para *B. bassiana* as alterações na virulência, decorrentes de cultivos sucessivos, sejam consequência de mudanças genéticas devido a um ciclo parassexual relatado por Paccola-Meirelles e Azevedo (1991), e que podem ser minimizadas pela passagem rotineira do isolado pelo hospedeiro ou pela utilização de isolamentos monospóricos. Contudo, após a seleção de um isolado de fungo para o controle de uma determinada praga, é imprescindível verificar rotineiramente se as características de virulência e esporulação foram preservadas durante o processo de produção em larga escala, onde o patógeno é cultivado por vários ciclos sucessivos em meio de cultivo.

Tolerância à Temperatura

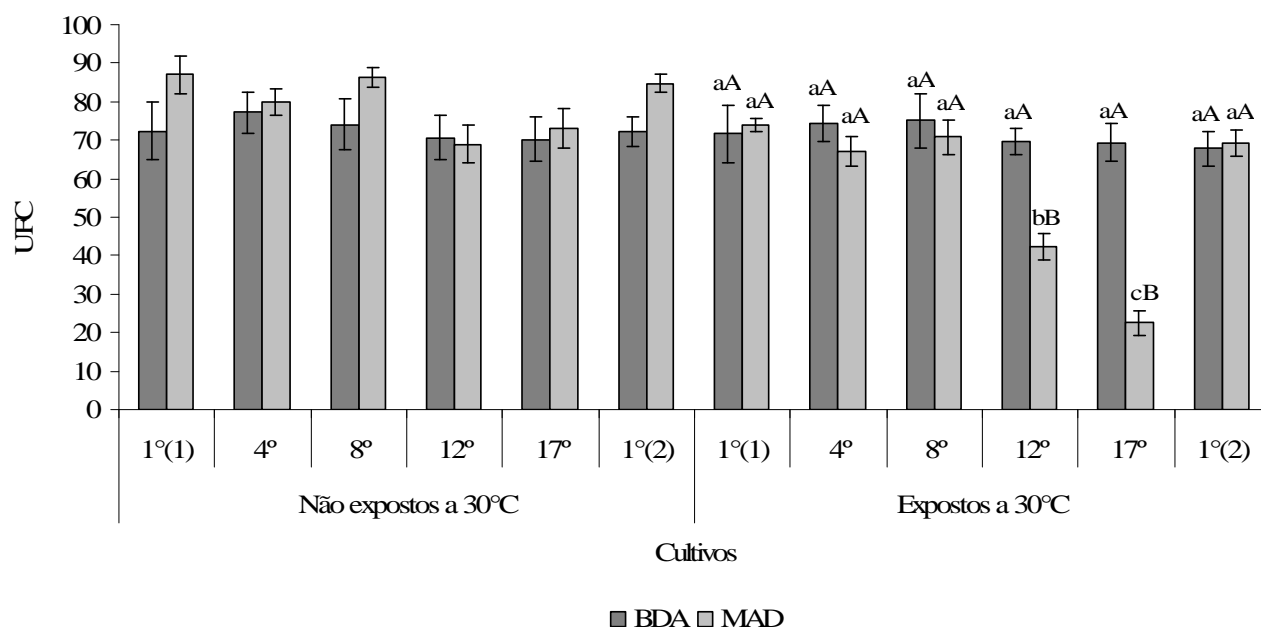
A eficácia dos fungos entomopatogênicos no campo é extremamente dependente das condições ambientais (ZIMMERMANN, 1982), sendo a temperatura uma das mais importantes, pois afeta o metabolismo dos fungos, alterando os processos de produção de enzimas, toxinas, germinação dos esporos, desenvolvimento do tubo germinativo, penetração, colonização e reprodução (ALVES; LECUONA, 1998). Com base na revisão de literatura realizada, este pode ser o primeiro trabalho que avalia o efeito de cultivos sucessivos em diferentes condições nutricionais em relação à termotolerância de *B. bassiana*.

Para os conídios não expostos a 30°C, a interação entre meios e cultivos sucessivos, assim como a comparação entre os cultivos, não foi significativa. Após a exposição a 30°C por 15 dias, os conídios provenientes do meio BDA não foram afetados pela temperatura, com número médio de UFC igual a 71,33, que foi próximo ao dos conídios não expostos (72,76). A termotolerância desses conídios não foi afetada pelos cultivos sucessivos (Figura 5.5).

Para o fungo oriundo dos cultivos sucessivos em MAD houve manutenção da tolerância até o 8º cultivo. No 12º houve redução das UFC, que foi mais acentuada no 17º cultivo. Após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro, houve recuperação da tolerância para os conídios do cultivo 1º(2), que não diferiu de 1º(1). Na comparação entre os meios, não

houve diferença entre BDA e MAD no 1^{o(1)}, 4^o, 8^o e 1^{o(2)} cultivo. Para os conídios provenientes do 12^o e 17^o cultivo, a tolerância foi maior para os conídios de obtidos em BDA (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), não expostos e expostos a 30°C por 15 dias. Interação não significativa para os conídios não expostos; e para os expostos a 30°C, as letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=14,73%); (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Um dos fatores que conferem maior termotolerância aos fungos é o acúmulo endógeno de trealose nos conídios (HALLSWORTH; MARGAN, 1995; SINGER; LINDQUIST 1998), que é favorecido pela adição de carboidrato no meio de cultivo (KIM et al., 2010). Isso pode explicar a maior tolerância dos conídios provenientes de BDA, que é um meio rico em C, pois além da adição de 20g l⁻¹ de dextrose, a batata apresenta em sua composição carboidratos e amido, que somados correspondem a 30% de sua composição. Já as proteínas, que são fontes de N, representam menos de 3 % (QUADROS et al., 2009), ao

contrário de MAD, que é constituído basicamente de insetos, os quais são altamente ricos em proteínas (40 a 75%) (VERKERK et al., 2007).

Esses resultados mostram que os conídios produzidos em BDA, além de serem mais tolerantes à temperatura elevada (30°C), apresentam manutenção desta característica após vários cultivos *in vitro*. E para as condições nutricionais de cultivo que não favoreçam esta manutenção, como ocorreu em MAD, a característica de termotolerância pode ser restaurada após a passagem do fungo pelo hospedeiro.

Tolerância à Radiação UV

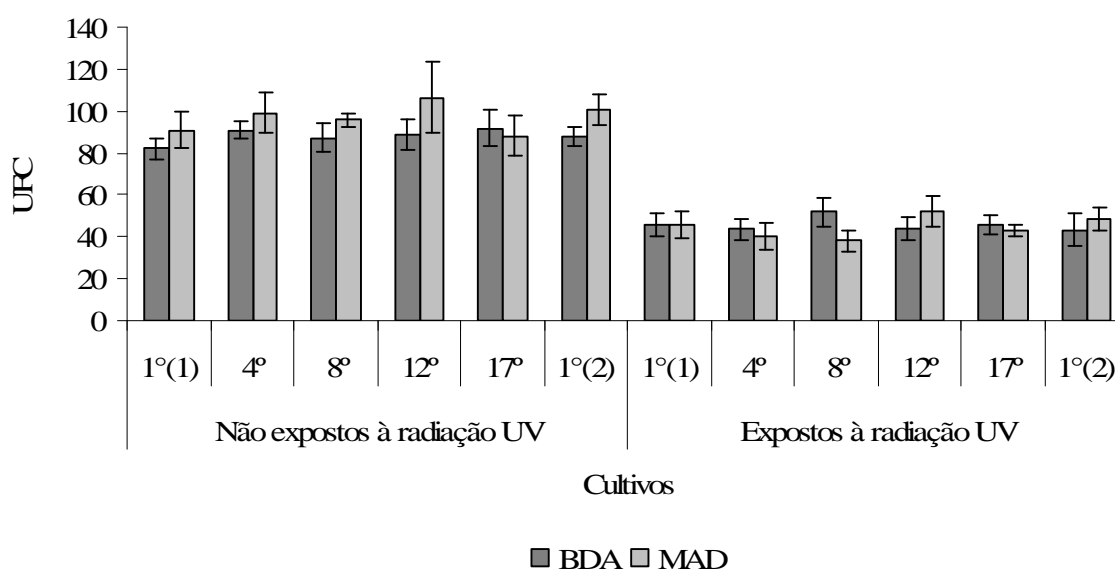
Assim como para a característica de termotolerância, este pode ser o primeiro estudo que avalia o efeito de cultivos sucessivos em diferentes condições nutricionais sobre a tolerância do fungo à radiação UV. Entre os fatores abióticos, esta radiação é considerada o mais prejudicial para os fungos entomopatogênicos (BRAGA et al., 2001a; CAGAN; SVERCEL, 2001). Isso ocorre porque a exposição à radiação pode causar danos às macromoléculas celulares, como o DNA, as proteínas, as biomembranas, o RNA e os ribossomos (ENGELBERG et al., 1994;. GRIFFITHS et al., 1998).

O principal método utilizado para avaliar o efeito da radiação UV sobre os fungos é a germinação após a exposição (BRAGA et al., 2001b; FARGUES et al., 1996; HUNT et al., 1994; MOORE et al., 1993; ZIMMERMANN, 1982). Contudo, pode ocorrer um atraso na germinação dos conídios sobreviventes (NASCIMENTO et al., 2010) e por esse motivo utilizou-se neste experimento o teste de UFC, que foi avaliado ao quinto dia.

O efeito dos meios e dos cultivos sucessivos, assim como da interação entre esses fatores, não foi significativo para a tolerância do fungo à radiação UV, tanto para os conídios não expostos (0 min.), como para os expostos (1 min.). Após a exposição, a redução na viabilidade, expressa em UFC, foi de aproximadamente 50% (Figura 5.6). Estes resultados mostram a sensibilidade do fungo à radiação, o que pode comprometer sua eficiência no campo. A tolerância dos fungos à radiação solar é uma característica quantitativa e complexa que envolve tanto os mecanismos de defesa, que impedem ou reduzem a ocorrência de danos aos componentes intracelulares, bem como vários sistemas que repararam os danos causados pela radiação durante a recuperação celular (CHELICO et al., 2006). Contudo, Yao et al. (2010) concluíram que, mesmo para os isolados mais tolerantes de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, os conídios não sobreviveriam a um dia de exposição à luz solar. Por esse motivo são necessárias medidas de proteção para a redução dos danos, que podem ser obtidas pela

utilização de fotoprotetores nas formulações (EDGINGTON et al., 2000; INGLIS et al., 1995; REDDY et al., 2008).

Figura 5.6 – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MAD (meio de *Alphitobius diaperinus*), após exposição à radiação ultravioleta por um minuto. Interação entre cultivos sucessivos e os meios não significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); CV: 18,37 e 26,36% para não expostos e expostos a radiação UV, respectivamente; (1) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; (2) primeiro cultivo em meio, após 17 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



5.4 CONCLUSÕES

Os cultivos sucessivos *in vitro* e as condições nutricionais do meio afetam o crescimento vegetativo, a produção de conídios, a virulência e a tolerância à temperatura de *B. bassiana*.

A atenuação do crescimento vegetativo e da produção de conídios (em MPE e arroz) é menos acentuada para os conídios provenientes de cultivos sucessivos em MAD. Esse meio favorece a manutenção destas características por um número maior de cultivos, e mesmo quando ocorre a redução, ela é menos acentuada que em meio BDA.

O meio MAD, constituído de insetos triturados, favorece a manutenção da virulência após 17° cultivos sucessivos *in vitro*, enquanto que em meio BDA ocorre redução desta característica.

Os conídios produzidos em BDA, mesmo após 17 cultivos *in vitro*, mantêm a tolerância à temperatura inalterada; já os produzidos em MAD sofrem redução após alguns cultivos.

Os conídios de *B. bassiana* são suscetíveis à radiação UV, porém esta característica não é afetada pelos cultivos sucessivos nos diferentes meios.

Após os cultivos sucessivos, as características de virulência, produção de conídios e tolerância à temperatura, que são atenuadas, podem ser restauradas após a passagem do fungo pelo hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ABRAHAN, T.; EASWARAMOOSTHY, S.; SANTHALAKSHMI, G. Mass Production of *Beauveria bassiana* isolated from sugarcane root borer, *Emmalocera depressella* swinhoe. **Sugar Technology**, Amsterdam, v.5, p.225-229, 2003.

ADAMES, M.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; PENÃ-CHORA, G.; HERNÁNDEZ-VELÁSQUEZ, V.M. Effects of passages through a suitable host of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricide-susceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Insect Science**, Madison, v.11, p.1-13, 2010.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-382.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.637-712.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.97-170.

ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATSITA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; MARQUES, E.J. Produção de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.215-238.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.845-870.

BARBOSA, F.R.; MOREIRA, W.A; SANTOS, G. Efeito de sucessivas repicagens em arroz na virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin para *Deois flavopicta*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.20, p.1115-1118, 1985.

- BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; De CROSS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.1335-1342, 2001.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.73, p.140-146, 2001b.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.78, p.98-108, 2001a.
- BROWNBIDGE, M.; COSTA, S.; JARONSKI, S.T. Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.77, p.280-283, 2001.
- BUTT, T.M.; COPPING, L.G. Fungal biological control agents. **Pesticide outlook**, p.186-191, 2000.
- CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, v.2, p.119-125, 2001.
- CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T.; SILVA, M.V.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology**, New York, v.50, p.257-261, 2005.
- CHELICO, L.; HAUGHIAN, J.L.; KHACHATOURIANS, G.G. Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.100, p.964-972, 2006.
- DAMIR, M. El. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium Anisopliae*. **Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.6, p.269-274, 2006.
- EDGINGTON, S.; SEGURA, H.; LA ROSA, W.; WILLIAMS, T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. **International Journal of Pest Management**, London, v.46, p.169-176, 2000.
- ENGELBERG, D.; KLEIN, C.; MARTINETTO, H.; STRUHL, K.; KARIN, M. The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. **Cell**, v.77, p.381-390, 1994.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v.135, p.171-181, 1996.

FENG, M.G.; PROPAWSKI, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol science and technology**, Oxford, v.1, p.3-4, 1994.

GARCÍA, M.T.G.; JIMÉNEZ, A.V.; PARDEY, A.E.B. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v.60, p.31-35, 2001.

GRIFFITHS, H.R.; MISTRY, P.; HERBERT, K.E.; LUNEC, J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Boca Raton, v.35, p.189-237, 1998.

GUEDES-FRAZZON, A.P.; VAZ JUNIOR, I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; HENNING, M. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.94, p.117-125, 2000.

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, Orlando, v.16, p.132-137, 1992.

HALL, R.A. Effect of repeated subculturing on agar and passing through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.36, p.216-222, 1980.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology**, Washington, UK, v.141, p.1109-1115, 1995.

HAYDEN, T.P.; BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Entomopathogenicity of several fungi toward the English grain aphid (Homoptera: Aphididae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.85, p.58-64, 1992.

HUNT, T.R.; MOORE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Effects of sunscreens, irradiance and resting periods on germination of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Entomophaga**, Paris, v.39, p.313-322, 1994.

HUSSAIN, A.; TIAN, M.; HE, Y.; LEI, Y. Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.104, p.166-171, 2010.

IGNOFFO, C.M.; McINTOSH, A.H.; GARCIA, C.; KROHA, M.; JOHNSON, J.M. Effects of successive *in vitro* and *in vivo* passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomurea rileyi*. **Entomophaga**, Paris, v.27, p.371-378, 1982.

INGLIS, D.G.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.W.; MAGAN, N. editors. **Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential**, CAB International, 2001, p.23-69.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v.5, p.581-590, 1995.

ITO, E.T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MITAGUI, D.T.; PINITTI, M.HP.; NEVES, P.M.O.J. Production of extracellular protease by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.50, p.217-223, 2007.

JARONSKI, S.T. Commercial development of deuteromycetous fungi of arthropods: a critical appraisal. In: SAMSON, R. A.; VLAK, J.M.; PETERS,R. **Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology** (eds) Netherlands: Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, 1986. p.653-656.

KAMP, A.M.; BIDOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.74-77, 2002.

KIM, J.S.; JE, Y.H; ROH, J.Y. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.37, p.419-423, 2010.

LATGÉ, J.P.; HALL, R.A.; CABRERA, R.I.; KERWIN, J.C. Liquid fermentation of entomopathogenic fungi. **Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology**. In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS R. (Ed.). **Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology** . Netherlands: Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, 1986, p.603-606.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto, 2003. 92p.

MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.122, p.605-616, 1993.

NASCIMENTO, E.; SILVA, S.H da, MARQUES, E. dos R.; ROBERTS, D.W.; BRAGA, G.U.L. Quantification of Cyclobutane Pyrimidine Dimers Induced by UVB Radiation in Conidia of the Fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.20, p.1-8, 2010.

PACCOLA-MEIRELES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.57, p.172-176, 1991.

PEREIRA, S.R.de M.; EIRA, A.F.da. Methodology for production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin in submerged cultivation: biomass sporulation, sugar concentration effect and inoculant cost. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, p.389-394, 1999.

QUADROS, D.A. de; IUNG, M.C.; FERREIRA, S.M.R.; FREITAS, R.J.S. de. Composição química de tubérculos de batata para processamento, cultivados sob diferentes doses e fontes de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, p.316-323, 2009.

QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Intra-specific variation in virulence and *in vitro* production macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of *in vivo* and *in vitro* passage on these factors. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.13, p.323-340, 2003.

REDDY, N.P.; KHAN, D.K.U.; VICTOR, J.S.; SHARMA, HC. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Pest Management Science**, Sussex, v.64, p.909-915, 2008.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; BRESSAN, D.F.; NEVES, P.M.O.J.; SILVA, E.R.L.; ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de fungos para o controle do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.231-240, 2006.

SANTORO, P.H; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.483-489, 2007.

SANTORO, P.H; NEVES, P.M.O.J; ALEXANDRE, T.M; SARTORI, D.; ALVES, L.F.A; FUNGARO, M.H Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.97, p.83-90, 2008.

SCULLY, L.R.; BIDOCHKA, M.J. The host acts as a genetic bottleneck during serial infections: an insect-fungal model system. **Current Genetics**, New York, v.50, p.335-345, 2006.

SHAH, F.A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C.J.; BUTT, T.M. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.276, p.60-66, 2007.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.251, p.259-266, 2005.

SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. **Molecular Cell**, Cambridge, v.1, p.639-648, 1998.

TIAGO, P.V.; FUNGARO, M.HP.; FURLANETO, M.C. Cuticledegrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.34, p.91-94, 2002.

VANDENBERG, J.D.; CANTONE, F.A. Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.85, p.40-45, 2004.

VERKERK, M.C.; TRAMPER, J.; TRIJP, J.C.M. van; MARTENS, D.E. Insect cells for human food. **Biotechnology Advances**, New York, v.25, p.198-202, 2007.

WENZEL, I.M.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v.34, p.7-14, 2006.

YAO, S.; YING, S.; FENG, M.; HATTING, J L. In vitro and in vivo responses of fungal biocontrol agents to gradient doses of UV-B and UV-A irradiation. **BioControl**, Dordrecht, v.55, p.413-422, 2010.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.40, p.36-40, 1982.

6 ARTIGO C: EFEITO DE PASSAGENS SUCESSIVAS DE *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. PELO HOSPEDEIRO NA QUALIDADE DOS CONÍDIOS

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de passagens sucessivas de *Beauveria bassiana* por *Alphitobius diaperinus* em relação ao crescimento vegetativo, à produção de conídios, à virulência, à tolerância à temperatura e à radiação UV. Foram utilizados três isolados inicialmente multiplicados em meio de cultivo e passados por 15 vezes pelos insetos. Os conídios provenientes dos insetos mortos, correspondendo a 1ª, 5ª, 10ª e 15ª passagem foram multiplicados em meio de cultivo para serem usados nos bioensaios. As passagens do fungo pelo hospedeiro afetaram a qualidade dos conídios, que variou entre os isolados. Houve redução do crescimento vegetativo para Unioeste 4 e Unioeste 40. E redução da produção de conídios em meio de cultivo para Unioeste 4, na 5ª passagem em comparação a 1ª, e Unioeste 40 na 15ª. O isolado CG 152 não foi afetado pelas passagens. Na produção em arroz, as passagens pelo hospedeiro proporcionaram um aumento do número de conídios para os três isolados. Para Unioeste 4 e Unioeste 40, a virulência foi máxima para os conídios de 15ª passagem, e para CG 152 houve um aumento a partir da 5ª, que se manteve constante até a 15ª. Esses aumentos foram superiores a 100% em relação à 1ª passagem. A tolerância dos conídios à radiação UV foi reduzida com o aumento do número de passagens, entretanto a tolerância à temperatura aumentou. A qualidade de *B. bassiana*, em relação à produção de conídios em arroz, virulência e tolerância à temperatura, é favorecida pelas passagens do fungo pelo hospedeiro, e pode melhorar a eficiência do controle biológico no campo, desde que sejam encontradas maneiras de proteger os conídios dos efeitos da radiação UV.

Palavras-chave: *Alphitobius diaperinus*. Controle biológico. Fatores abióticos. Fungos entomopatogênicos. Passagens *in vivo*. Produção de conídios. Radiação UV. Temperatura.

EFFECT OF SUCCESSIVE SUBCULTURING OF *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. IN THE HOST IN CONIDIAL QUALITY

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of successive subculturing of *Beauveria bassiana* in *Alphitobius diaperinus* on vegetative growth, conidial yield, virulence, and on temperature and UV radiation tolerance. Three isolates were used, and were initially multiplied in culture medium and subcultured 15 times in the insect. Spores from cadavers, of the 1st, 5th, 10th and 15th subcultures were inoculated in the medium to produced conidia for bioassays. The fungus successive subcultures in the host affected the conidia quality, that varied among isolates. There was a reduction in vegetative growth for Unioeste 4 and Unioeste 40. At the 5th subculture in the medium there was a reduction in conidial production for Unioeste 4, when compared to the 1st subculture, and the same was observed for Unioeste 40 at the 15th subculture. The isolate CG 152 was not affected by successive subcultures. For conidial production in rice, after successive subcultures in the insect an increase in conidia

yield was observed for the three isolates. For Unioeste 4 and Unioeste 40, conidia from the 15th subculture were the most virulent, and for CG 152 the virulence increase began after the 5th subculture, and remained constant until the 15th. These increases were greater than 100% compared to the 1st subculture. Conidial tolerance to UV radiation was reduced by increasing the number of successive subcultures, however, the temperature tolerance increased. The quality of *B. bassiana*, in relation to conidial production on rice, virulence and temperature tolerance, was favored by the successive subcultures of the fungus in the host, and can be used to improve biological control efficiency in the field.

Keywords: *Alphitobius diaperinus*. Controle biológico. Fatores abióticos. Fungos entomopatogênicos. Passagem *in vivo*. Conidial Yield. UV Radiation. Temperature.

6.1 INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos apresentam grande variabilidade genética e com técnicas apropriadas é possível selecionar isolados altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para o controle de pragas de maneira eficiente (ALVES, 1998). A espécie *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma importante praga em aviários, para a qual são apresentados registros de ocorrência natural de fungos entomopatogênicos (ALVES et al., 2004; ALVES et al., 2005; STEINKRAUS et al., 1991). Porém, estudos de seleção de isolados mostram que esse inseto apresenta alta resistência aos fungos, principalmente na fase adulta, onde grande parte dos isolados não são patogênicos ou apresentam baixa virulência.

Entre 30 isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., Santoro et al. (2008) verificaram que apenas quatro foram responsáveis por mortalidade confirmada corrigida entre 40 e 67%, e o restante apresentou mortalidade inferior a 3%. Resultados semelhantes foram observados por Rohde et al. (2006) para isolados de *B. bassiana* e de *Metarhizium anisopliae* (Metsch), contudo, uma concentração maior de conídios possibilitou níveis de mortalidade mais elevados para alguns isolados e maior suscetibilidade para larvas. Steinkraus et al. (1991) também observaram que as larvas de *A. diaperinus* são mais suscetíveis a *B. bassiana* e que há um incremento na virulência após a passagem do fungo pelo hospedeiro. Esses resultados contrastam com a facilidade de se selecionar isolados virulentos para outras espécies como *Aphis gossypii* (Glover) (Homoptera: Aphididae) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) (LOUREIRO; MOINO JÚNIOR, 2006), *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) (NEVES; HIROSE, 2005), *Oligonychus yothersi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) (OLIVEIRA et al., 2004), *Bemisia tabaci* (Gennadius)

(Hemiptera: Aleyrodidae; = *Bemisia argentifolii* Bellows e Perring) biótipo B (WRAIGHT et al., 1998).

A manutenção da viabilidade do patógeno é importante no controle microbiano, devendo-se manuseá-lo adequadamente para manter sua virulência ou melhorá-la por meio de métodos genéticos, físicos, químicos ou processos biológicos, e dentre esses se recomenda a passagem sucessiva em insetos alvo (ALVES; PEREIRA, 1998; AZEVEDO, 1998; SERAFINI et al., 2001). A utilização desta técnica pode ser uma das alternativas para se conseguir isolados mais virulentos a *A. diaperinus*. A eficácia dos fungos entomopatogênicos no campo também depende das condições ambientais (ZIMMERMANN, 1982). Entretanto, a quase totalidade dos estudos sobre o efeito da passagem do fungo pelo hospedeiro limita-se a avaliar características relacionadas à virulência, em detrimento dos efeitos sobre a resposta do fungo a fatores abióticos, como radiação UV e temperatura, que podem comprometer a eficiência do controle biológico.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de passagens sucessivas de *B. bassiana* por *A. diaperinus*, sobre o crescimento vegetativo, a produção de conídios, a virulência e a tolerância à temperatura e à radiação UV.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Passagens Sucessivas do Fungo pelo Hospedeiro

Foram utilizados os isolados de *B. bassiana* CG 152, Unioeste 4 e Unioeste 40, que fazem parte do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Estadual de Londrina. Eles foram selecionados para o controle de *A. diaperinus* e apresentam alta similaridade genética; contudo, foram observadas diferenças entre eles quanto ao desenvolvimento *in vitro* e virulência (SANTORO et al., 2008). Os conídios dos isolados foram multiplicados em placas de Petri com meio para a produção de esporo de *Beauveria* spp. (MPE) (ALVES, 1998). As placas foram incubadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h), por 10 dias. Os insetos utilizados, adultos de *A. diaperinus*, foram coletados em aviário localizado no município Londrina, PR.

Os conídios produzidos em MPE foram removidos do meio, e uma quantidade de 50 mg foi inoculada, por polvilhamento, sobre 100 adultos de *A. diaperinus*, previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 2% e lavados com água destilada. Ao quinto dia após a inoculação, os insetos mortos foram novamente desinfetados e

acondicionados em câmara úmida climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$) por cinco a oito dias, para o desenvolvimento do fungo sobre os insetos. Após a plena esporulação do fungo sobre os insetos, 10 deles foram utilizados para inocular um novo grupo de 100 insetos. O restante dos insetos mortos, com conídios de 1ª passagem, foram armazenados em tubos esterilizados a -6°C , para posterior utilização.

No segundo dia após a inoculação do segundo grupo de 100 insetos, os insetos mortos, que serviram de fonte de inóculo, foram retirados do recipiente, onde permaneceram apenas os insetos vivos. Esses, após a morte e exteriorização do patógeno, foram também utilizados como fonte de inóculo para um novo grupo de 100 insetos e assim sucessivamente até a 15ª passagem do fungo pelo hospedeiro. Todo o procedimento, para cada isolado, foi feito em duplicata, ou seja, dois grupos de 100 insetos por inoculação.

Os conídios produzidos sobre o corpo dos insetos, que estavam armazenados a -6°C , correspondendo a 1ª, 5ª, 10ª e 15ª passagem do fungo pelo hospedeiro, foram multiplicados em MPE. Após 10 dias de incubação em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h), os conídios produzidos sobre o meio foram removidos com uma espátula, acondicionados em tubos esterilizados e armazenados a -6°C para serem utilizados nos bioensaios. O meio MPE também foi utilizado para avaliar o crescimento vegetativo, produção de conídios e tolerância à temperatura e à radiação UV.

Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios

Em placa placas de Petri (9 cm Ø) com meio de cultivo, o fungo foi repicado em um ponto central com uma alça de platina pontiaguda, a fim de se obter apenas uma colônia. As placas foram incubadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h), por 10 dias. O crescimento vegetativo foi determinado pelo cálculo da área da colônia, feito com a média de dois diâmetros opostos. Das mesmas colônias avaliou-se a produção de conídios, que foram removidos do meio com o auxílio de uma espátula e recolhidos em um tubo. Os conídios foram suspensos em solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v) e submetidos à agitação em vortex por 30 segundos. Após as diluições necessárias, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Considerou-se como produção o número total de conídios da colônia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4×3) (passagens do fungo pelo inseto \times isolados), com cinco repetições.

Produção de Conídios em Arroz

Em 1L de água destilada, em ponto de ebulição, foi adicionado 500g de arroz parboilizado, que foi cozido por três minutos no aparelho microondas, em potência máxima. O tempo de cozimento foi suficiente para que os grãos atingissem uma consistência “emborrachada”. A água não absorvida pelo arroz foi escoada em peneira e 65g do arroz foi colocado em garrafas de vidro (500ml). As garrafas foram tampadas com papel toalha que foi preso ao gargalo por um elástico e esterilizadas em autoclave por 30 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, cada garrafa foi inoculada com 1,5 ml de uma suspensão com $1,0 \times 10^7$ conídios ml^{-1} . As garrafas foram incubadas câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h) por 15 dias.

Para avaliar a produção de conídios, foi adicionado 300 ml de uma solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v) em cada garrafa. Estas foram submetidas à agitação manual por três minutos e, após as diluições necessárias, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4×3) (passagens do fungo pelo inseto \times isolados), com cinco repetições.

Virulência a *Alphitobius diaperinus*

Em placa de acrílico (6 cm Ø) foram colocados 50 insetos adultos que foram pulverizados (pulverizador Airbrush acoplado a um compressor/aspirador Fanem-DiaPump) com 0,5 ml de uma suspensão de 1×10^6 conídios ml^{-1} . A testemunha foi pulverizada com solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v), utilizada como veículo da suspensão do fungo. Os insetos foram alimentados com ração de milho esterilizada e mantidos em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotófase 12 h). A avaliação foi realizada ao 10º dia, quando os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida climatizada por mais cinco dias, para confirmar a mortalidade pelo fungo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4×3)+1 (passagens do fungo pelo inseto \times isolados) + testemunha, com cinco repetições de 50 insetos.

Tolerância à Radiação UV

A avaliação da tolerância dos conídios à radiação UV foi feita pelo teste de unidades formadoras de colônias (UFC), pois a exposição dos conídios à radiação UV pode atrasar a germinação (NASCIMENTO et al., 2010).

Sobre a superfície do meio MPE foi espalhado, com alça de Drigalski, 0,1 ml de uma suspensão com 1×10^3 conídios ml^{-1} . As placas sem tampa foram colocadas em câmara de fluxo laminar, sob lâmpada germicida (253,7 nm, Philips TUV, baixa pressão 30W) a uma distancia de 52 cm. Após o período de exposição à radiação UV por um minuto, as placas foram fechadas com as tampas e transferidas para câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotófase de 12 h). O número de colônias formadas foi avaliado após cinco dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4×3) (passagens do fungo pelo inseto \times isolados), com cinco repetições.

Tolerância à Temperatura

Os conídios, provenientes dos cultivos referentes às passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro, foram armazenados em tubos de ensaio esterilizados e acondicionados em câmara climatizada a 30°C por 0 e 15 dias, no escuro. A viabilidade dos conídios foi avaliada pelo teste de germinação, no qual 0,1 ml da suspensão com 1×10^7 conídios ml^{-1} foi espalhada, com alça de Drigalski, sobre a superfície do meio. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotófase 12 h) e, após 20 h, aproximadamente 200 conídios, subdivididos em dois campos da placa, foram observados em microscópio óptico para quantificar o percentual de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4×3) (passagens do fungo pelo inseto \times isolados), com cinco repetições.

Análises Estatísticas

Os dados dos tratamentos com delineamento inteiramente casualizado e inteiramente casualizado em esquema fatorial foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A comparação entre as médias do fatorial com cada testemunha, foi feita pelo teste Dunnett ($p < 0,05$).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados apresentam similaridade genética acima de 85%, a qual está associada virulência a *A. diaperinus* (SANTORO et al., 2008). Mesmo sendo considerada baixa, a variabilidade genética entre eles pode ter sido responsável pelas diferentes respostas decorrentes das passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro, em relação a todas variáveis avaliadas neste trabalho.

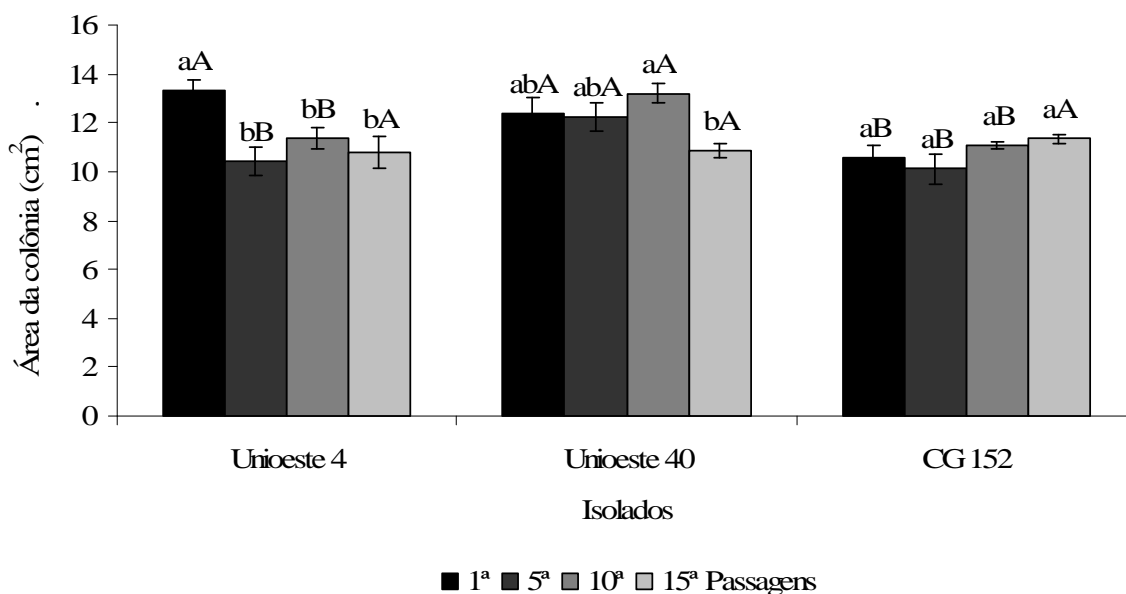
Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios

A estabilidade da capacidade de produzir conídios é uma característica importante para o desenvolvimento de produtos comerciais a base de fungos entomopatogênicos (VANDENBERG; CATONE 2004). Porém, os cultivos sucessivos *in vitro* e *in vivo* podem alterar características fenotípicas, como o crescimento vegetativo e a produção de conídios (CRECY et al., 2009; SCULLY; BIDOCHKA, 2005, VANDENBERG; CATONE, 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram uma interação significativa entre as passagens do fungo pelo hospedeiro e os isolados. Houve redução do crescimento vegetativo em meio MPE para o isolado Unioeste 4 proveniente da 5^a, 10^a e 15^a passagem, que não diferiram entre si. Para Unioeste 40 houve redução na 15^a passagem quando comparada a 10^a. E para CG 152 não houve alteração desta característica. Na comparação entre os isolados na 1^a passagem, o crescimento vegetativo foi maior para Unioeste 4 e Unioeste 40. Na 5^a e 10^a foi maior em Unioeste 40; e na 15^a passagem não houve diferença entre os isolados (Figura 6.1).

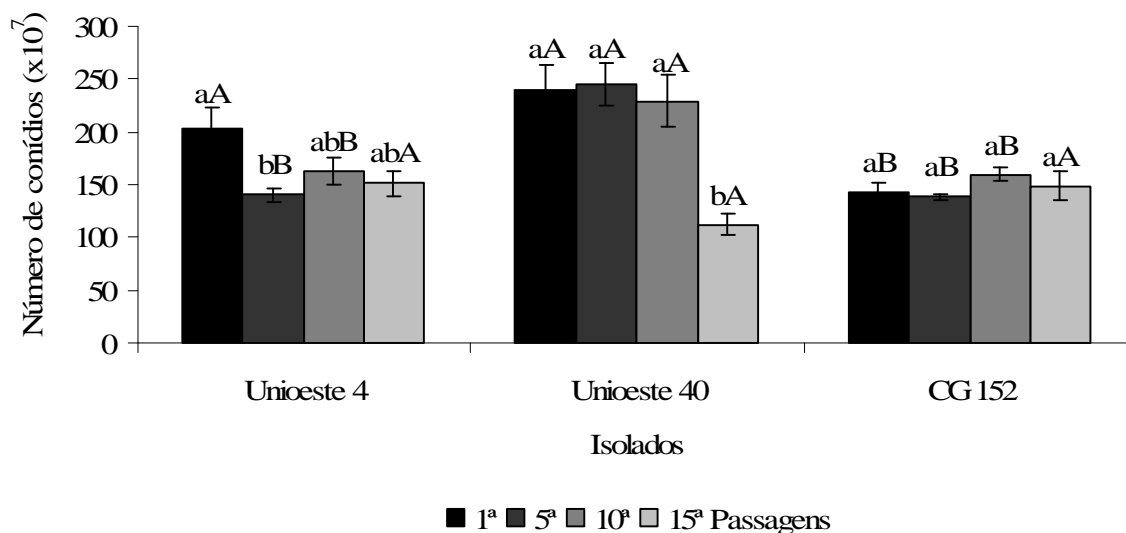
A produção de conídios foi pouco influenciada pelas passagens do fungo pelo hospedeiro. Para Unioeste 4, a produção foi maior para conídios de 1^a passagem, quando comparados aos de 5^a, no entanto, não diferiu da 10^a e 15^a. Para o isolado Unioeste 40 houve redução apenas para os conídios de 15^a passagem, que foi superior a 50% quando comparada às demais. Para CG 152, a produção, assim como o crescimento vegetativo, não foi alterada. Na comparação entre os isolados, as produções de Unioeste 4 e Unioeste 40 não diferiram entre si e foram superior a de CG 152 na 1^a passagem. Na 5^a e 10^a o mais produtivo foi o Unioeste 40; e na 15^a passagem não houve diferença entre os isolados (Figura 6.2).

Figura 6.1 – Crescimento vegetativo (cm^2) *in vitro* de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após dez dias de incubação; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=9,50%).



O efeito dos cultivos sucessivos *in vitro* e *in vivo*, em relação à produção de conídios, é altamente dependente de características intraespecíficas dos isolados. Vandenberg e Catone (2004) constataram redução na produção de conídios do isolado 4461 de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) após 5 e 10 passagens por *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Homoptera: Aphidoidea), porém não observaram diferenças após 30 cultivos *in vitro* ou 15 passagens por *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae). Para o isolado 4481 não houve diferença após os cultivos *in vitro* e *in vivo*. A produção de conídios foi reduzida para o isolado 4491, após 30 passagens *in vitro*, e aumentou na 15ª passagem por *D. noxia*.

Figura 6.2 – Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios colônia⁻¹) *in vitro* de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após dez dias de incubação; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=19,61%).



As reduções no crescimento vegetativo e na produção de biomassa em meio BDA foram constatadas para *Aspergillus flavus* (Link) após várias passagens do fungo por *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae). A redução destas características representa uma diminuição na capacidade do fungo em crescer como saprófita no meio de cultivo, que é decorrente da passagem forçada pelo hospedeiro (SCULLY; BIDOCHKA, 2005). Com exceção do isolado CG 152, que apresentou estabilidade do crescimento vegetativo e produção de conídios, o hospedeiro pode ter exercido uma pressão de seleção sobre os isolados de Unioeste 4 e Unioeste 40 de *B. bassiana*. Possivelmente, o maior número de passagens do fungo pelo hospedeiro iria favorecer melhor adaptação dos isolados aos nutrientes contidos no inseto, reduzindo sua capacidade de se desenvolver como saprófita nos meios de cultivo.

Produção de Conídios em Arroz

A viabilidade de se utilizar fungos como agente de controle biológico de pragas depende de numerosas restrições biológicas, incluindo a habilidade de produzir altas concentrações de propágulos infectivos e estáveis a um custo razoável (JARONSKI, 1986; LATGÉ et al., 1986). No Brasil, os substratos sólidos, em especial grãos de arroz, são os mais

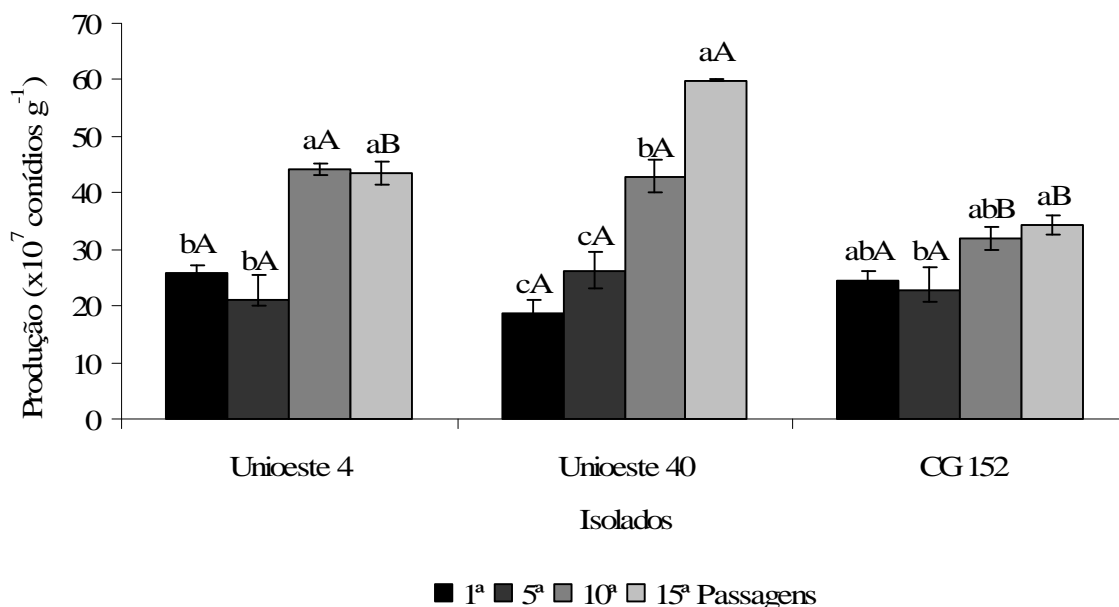
utilizados para a produção de fungos entomopatogênicos em larga escala, principalmente devido ao baixo custo (ALVES; PEREIRA 1998; LEITE et al., 2003). Por esse motivo, é fundamental conhecer o efeito de passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro em relação à produção de conídios em arroz.

A produção de conídios em arroz não seguiu a mesma tendência observada para o cultivo em MPE. Os componentes nutricionais, bem como a quantidade de nutrientes disponíveis podem ter um profundo efeito sobre o crescimento da cultura, produção de conídios e na morfologia dos fungos entomopatogênicos (KAMP; BIDOCHKA, 2002). Esses efeitos podem variar entre isolados de uma mesma espécie (BARBOSA et al., 2002; DAMIR, 2006; LOUREIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2004), e são extremamente difícil de serem explicados, pois existe uma relação complexa entre o isolado e meio de cultivo, que são compostos de um grande número de nutrientes em diferentes concentrações.

Possivelmente, algum nutriente, ou a combinação de vários existentes no arroz, possibilitou um aumento da produção de conídios após as passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro. Para o isolado Unioeste 4, a produção aumentou em aproximadamente duas vezes após a 10^a passagem e não diferiu na 15^a. Para Unioeste 40 houve um incremento na 10^a passagem, e foi maior na 15^a, representando um aumento de aproximadamente três vezes em relação a 1^a. Em CG 152 o aumento foi gradativo, com diferença apenas entre a 1^a e 15^a passagem, na qual a produção foi cerca de 1,5 vezes maior (Figura 6.3).

Na comparação entre os isolados, não houve diferença na 1^a e 5^a passagem. A produção na 10^a foi maior para Unioeste 4 e Unioeste 40, que não diferiram entre si. Na 15^a o isolado Unioeste 40 teve a maior produção (Figura 6.3). Uma das principais vantagens de *B. bassiana* e outros fungos entomopatogênicos é a possibilidade de cultivo *in vitro* (LEITE et al., 2003), e o aumento ou a manutenção da capacidade produtiva é uma característica desejável na produção em larga escala. Por esse motivo, é importante conhecer os efeitos das passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro em relação à produção de conídios em arroz.

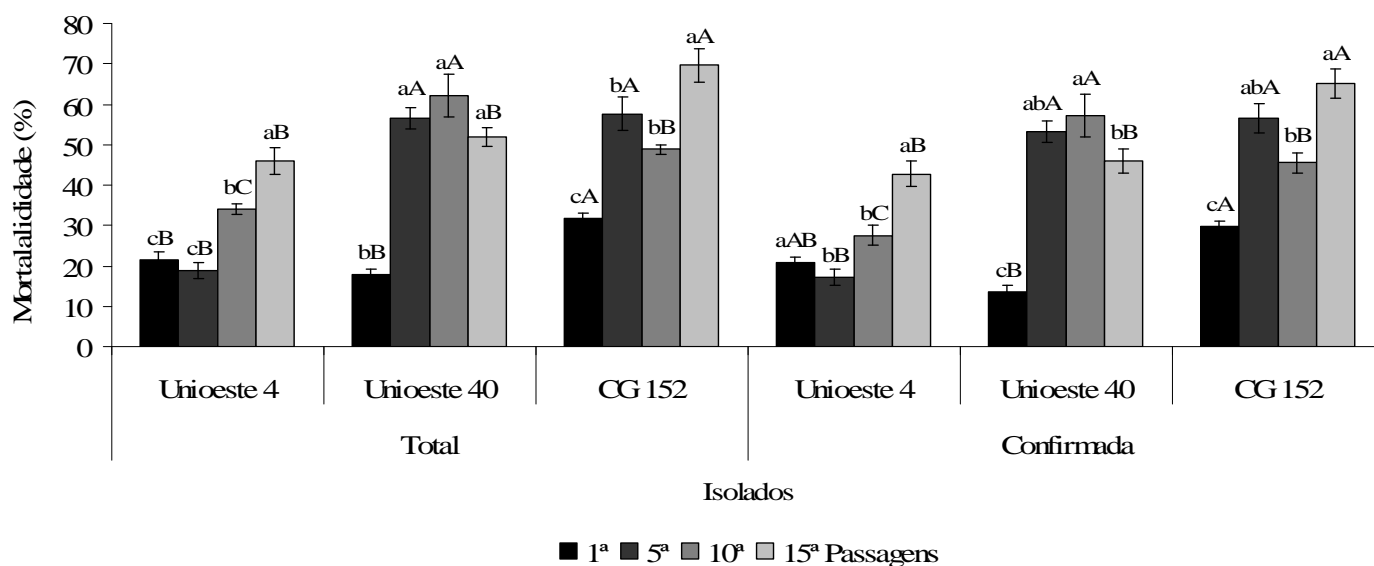
Figura 6.3 – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* ($\times 10^7$ conídios g^{-1}) em arroz cozido, inoculado com conídios provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após 15 dias de incubação; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CV=18,44%);



Virulência a *Alphitobius diaperinus*

Observou-se que as passagens do fungo pelo hospedeiro proporcionaram incrementos da virulência para os três isolados, que foram, após a 15ª passagem, superiores a 100%. Para Unioeste 4, o aumento da mortalidade total foi observado na 10ª passagem, entretanto, para mortalidade confirmada ocorreu apenas após a 15ª passagem. O aumento da virulência para Unioeste 40 ocorreu na 5ª passagem, que se manteve elevada após as demais. A mortalidade total e confirmada, para o isolado CG 152, foi crescente ao longo das passagens sucessivas, sendo máxima na 15ª. Na comparação entre os isolados, a mortalidade total na 1ª passagem foi maior para o CG 152, e na confirmada esse isolado não diferiu do Unioeste 4. Para a mortalidade total e confirmada na 5ª passagem, os melhores isolados foram CG152 e Unioeste 40, que não diferiram entre si. Unioeste 40 foi melhor na 10ª, e CG 152 na 15ª (Figura 6.4).

Figura 6.4 – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por conídios de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por insetos da mesma espécie; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para mortalidade total (CV=14,98%) e confirmada (CV=16,61%). As mortalidades nas testemunhas total (3,60%) e confirmada (0%) diferem dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$);



Os fungos Hyphomycetes podem adaptar-se a determinados hospedeiros após passagens forçadas pela espécie (FERRON, 1985). Conídios de *M. anisopliae* se tornaram mais virulentos a *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) na medida em que foram passados pelo hospedeiro. O incremento foi observado na quarta passagem, sendo mais acentuado na sétima (ADAMES et al., 2010). Song e Feng (2010) verificaram que isolados de *B. bassiana* apresentaram aumento da virulência após a passagem por *Nilaparvata lugens* (Stal) (Homoptera: Delphacidae), que foi de três a quatro vezes nas duas primeiras passagens, e não foi alterado na terceira. O aumento foi correlacionado com o incremento na produção da protease Pr1, que é responsável pela degradação da cutícula dos insetos (SHAH et al., 2005), e pelo aumento do potencial zeta e da hidrofobicidade, que são propriedades de superfície, relacionadas com uma melhor adesão dos conídios à cutícula do inseto (BOUCIAS et al., 1988; HOLDER; KEYHANI, 2005; CHO et al., 2007).

A estabilidade da virulência após os cultivos *in vitro* é uma característica desejável para um agente de controle biológico produzido em escala comercial (VANDENBERG;. CANTONE, 2004). Contudo, a possibilidade de aumentar a virulência após passagens sucessivas do fungo pelo hospedeiro é uma estratégia importante para o

controle de espécies que apresentam maior resistência à doença, como ocorre com adultos de *A. diaperinus*.

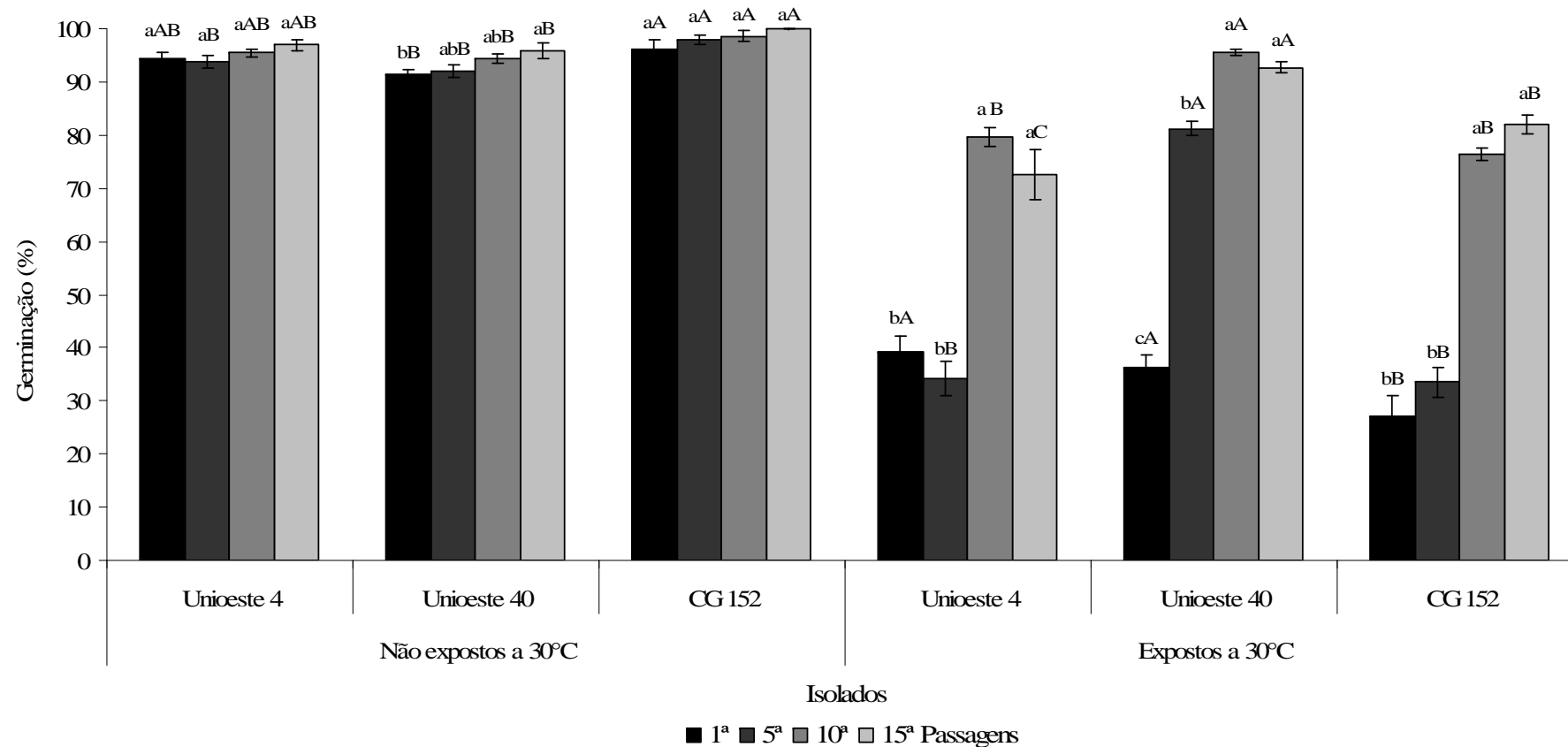
Tolerância à Temperatura

Para os conídios que não foram expostos a temperatura de 30°C, as passagens do fungo pelo hospedeiro afetaram apenas a viabilidade do isolado Unioeste 40, que apresentou um pequeno incremento da germinação na 15ª passagem. A viabilidade do isolado CG 152 foi superior a do Unioeste 40, em todas as passagens, e superior ao Unioeste 4 apenas na 5ª (Figura 6.5).

Quando os conídios foram expostos a 30°C por 15 dias, foi possível observar que ocorreu um aumento da tolerância na medida em que o fungo foi passado pelo hospedeiro. Para o isolado Unioeste 40 a viabilidade após a 10ª passagem foi próxima à viabilidade dos conídios que não foram submetidos à condição de estresse. Para os isolados Unioeste 4 e CG 152 o aumento ocorreu na 10ª passagem, que não diferiu da 15ª. Esse aumento foi superior a 100%, com mais de 70% dos conídios viáveis. A tolerância à temperatura, para o isolado CG 152 começou a aumentar já na 5ª passagem e foi maior na 10ª e 15ª passagem, que não diferiram entre si. O isolado Unioeste 40 apresentou maior a tolerância à temperatura quando comparado com os outros dois isolados nas diferentes passagens, exceto na 1ª em que não diferiu do Unioeste 4 (Figura 6.5).

Apesar de ser um dos fatores limitantes da eficiência do controle biológico, termotolerância dos fungos entomopatogênicos é pouco estudada, e não foram encontrados relatos dos efeitos de cultivos sucessivos *in vivo* e *in vitro* sobre esta característica. Os fungos apresentam a capacidade de se adaptar as diferentes condições de temperatura (BIDOCHKA et al., 2001; FARGUES et al., 1997; RANGEL et al., 2005). Mas os resultados aqui observados revelam que a adaptação do fungo ao hospedeiro, por meio da passagem forçada, pode trazer como consequência o aumento de outra característica desejável, como a termotolerância.

Figura 6.5 – Viabilidade de conídios (germinação %) de *Beauveria bassiana*, provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após armazenagem a 30°C por 15 dias; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para conídios não expostos (CV=2,58%) e expostos a 30°C (CV=9,13%).



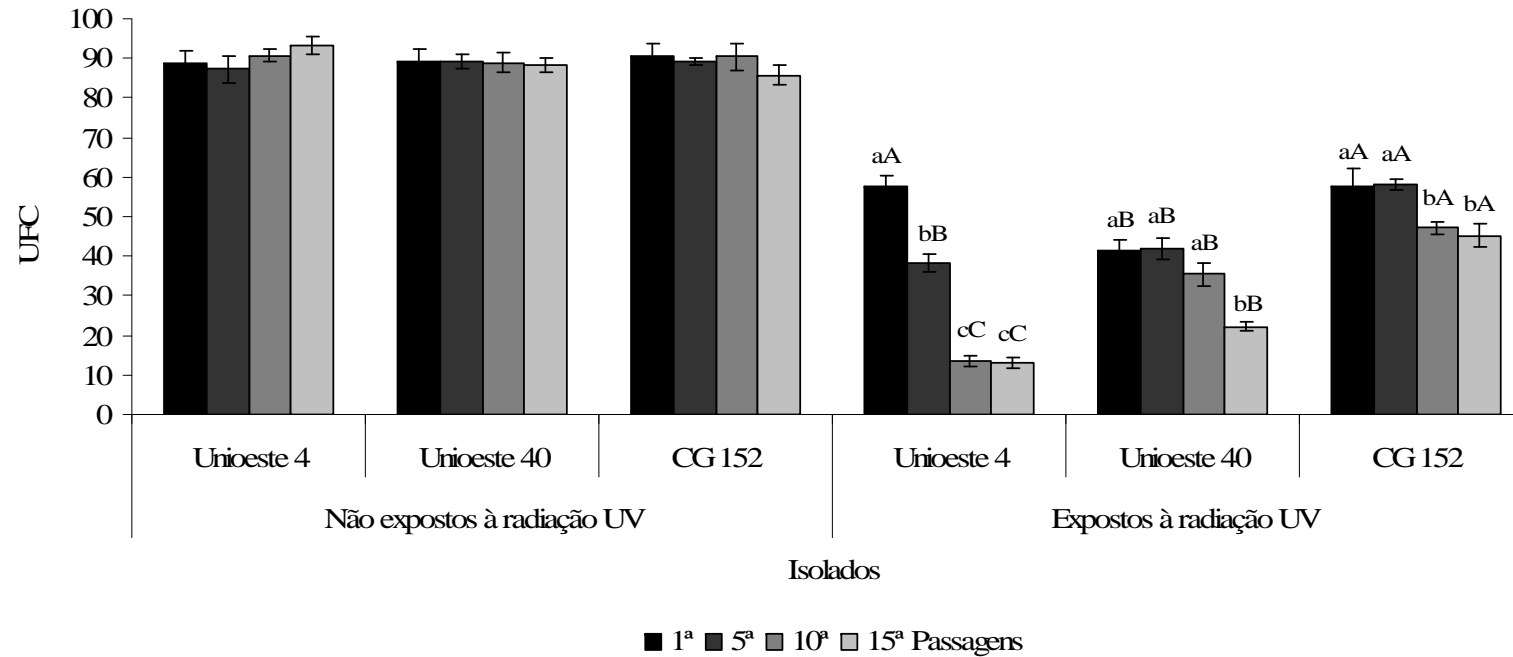
Tolerância à Radiação UV

Os diferentes isolados foram sensíveis à radiação, com redução de até 85% da viabilidade. A radiação solar afeta negativamente o patógeno (RANGEL et al., 2004), e um dos fatores da inativação é a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano no DNA (CHELICO et al., 2005). Yao e Ying (2010) acreditam que mesmo os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* mais tolerantes à radiação UV não sobreviveriam a um dia de exposição à luz solar, e recomenda, além da seleção de isolados, o uso de fotoprotetores nas formulações (NGLIS et al., 1995; EDGINGTON et al., 2000; REDDY et al., 2008). Antes da exposição à radiação UV a viabilidade dos conídios não foi afetada pelas passagens do fungo pelo hospedeiro e não houve diferença entre os isolados. Após a exposição o aumento do número de passagens foi prejudicial à tolerância dos conídios à radiação UV (Figura 6.6).

Na comparação entre as passagens, o isolado Unioeste 4 apresentou redução na tolerância logo na 5ª passagem, sendo mais acentuada na 10ª e 15ª, que não diferiram entre si. Para o Unioeste 40 não houve diferença entre a 1ª, 5ª e 10ª passagem, com redução na 15ª. As menores reduções ocorreram para o isolado GC 152 na 10ª e 15ª passagens, que não diferiram. Na comparação entre os isolados, a viabilidade do CG 152 foi superior, exceto na 1ª passagem em que não diferiu do Unioeste 4. Na 10 e 15ª passagem a tolerância à radiação UV foi menor para o isolado Unioeste 4 (Figura 6.6). As diferenças genéticas entre esses isolados podem ter sido responsáveis pela variabilidade das respostas em relação à sensibilidade à radiação UV. Alguns estudos mostram uma grande variabilidade na tolerância à radiação solar entre isolados da mesma espécie (FARGUES et al., 1996; FERNANDES et al., 2007), o que pode ser uma resposta relacionada à adaptação natural às diferentes condições ambientais (NASCIMENTO et al., 2010).

A possibilidade de incremento da virulência após as passagens do fungo pelo hospedeiro tem sido relatada (ADAMES et al., 2010; SONG; FENG, 2011; VANDENBERG; CATONE, 2004) e é uma estratégia importante para melhorar a eficiência de controle. Mas, nas condições de campo, a eficiência é afetada pelos fatores abióticos, principalmente à radiação UV (BRAGA et al., 2001; CAGAN; SVERCEL, 2001), assim, é essencial conhecer os efeitos das passagens do fungo pelo hospedeiro em relação à tolerância à radiação UV. Este trabalho mostra que o aumento das passagens de *B. bassiana* por *A. diaperinus* foi prejudicial, com redução da tolerância dos conídios à radiação UV, o que pode comprometer a eficiência de controle, mesmo havendo um incremento da virulência.

Figura 6.6 – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de passagens sucessivas por *Alphitobius diaperinus*, após exposição à radiação ultravioleta por um minuto; letras minúsculas comparam as passagens para um mesmo isolado, e maiúsculas comparam os isolados em uma mesma passagem, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), para conídios não expostos (CV=6,48%) e expostos à radiação UV (13,93%).



6.4 CONCLUSÕES

As passagens sucessivas de *B. bassiana* por *A. diaperinus* afetam o crescimento vegetativo, a produção de conídios, a virulência e a tolerância à temperatura e à radiação UV, com respostas diferentes entre os isolados.

Pode ocorrer redução do crescimento vegetativo e da produção de conídios em meio MPE, porém, esta característica é dependente do isolado. Já a produção de conídios em arroz é favorecida pelas passagens do fungo, com maior ou menor intensidade, dependendo do isolado.

A virulência e a tolerância à temperatura são características beneficiadas, com incrementos superiores a 100% após a 15ª passagem do fungo pelo inseto.

A tolerância dos conídios à radiação UV é afetada negativamente, e para que esse efeito não comprometa os benefícios alcançados pelo aumento da produção de conídios em arroz, virulência e tolerância à temperatura, é aconselhável que sejam utilizadas medidas que protejam os conídios dos danos causados pelos raios UV.

REFERÊNCIAS

ADAMES, M.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; PENÃ-CHORA, G.; HERNÁNDEZ-VELÁSQUEZ, V.M. Effects of passages through a suitable host of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricide-susceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Insect Science**, Madison, v.11, p.1-13, 2010.

ALVES, L.F.A.; ALVES, V.S.; BRESSAN, D.F.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. (Moniliales: Moniliaceae) em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais em Cascavel, PR, Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, p.793-795, 2004.

ALVES, L.F.A.; GASSEN, M.H; PINTO, F.G.S.; NEVES, P.M.O.J, ALVES, S.B. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, p.507-510, 2005.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998b. p.289-382.

ALVES, S.B.; LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.97-170.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.845-867.

AZEVEDO, J.L. **Genética de microorganismos**. Goiânia: UFG, 1998. 490 p.

BARBOSA, C.C.; MONTEIRO, A.C.; CORREIA, A.C.B; PEREIRA, G.T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.821-829, 2002.

BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; De CROSS, J.N.A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.1335-1342, 2001.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGÉ, J.P. Nonspecific factors involved in the attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1797-1805, 1988.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.78, p.98-108, 2001.

BROWNBRIDGE, M.; COSTA, S.; JARONSKI, S.T. Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.77, p.280-283, 2001.

CAGAN, L; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, v.2, p.228-232, 2001.

CHELICO, L.C.; HAUGHIAN, J.L, WOYTOWICH, A.E.; KHACHATOURIANS, G.G.; Quantification of ultraviolet-C irradiation induced cyclobutane pyrimidine dimers and their removal in *Beauveria bassiana* conidiospore DNA. **Mycologia**, New York, v.97, p.621-627, 2005.

CHO, E.M.; KIRKLAND, B.H; HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. Phage display cDNA cloning and expression analysis of hydrophobins from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. **Microbiology**, New York, v.153, p.3438-3447, 2007.

CRECY, E. de; JARONSKI, S.; BENJAMIN, L.; LYONS, T.J.; NEMAT, O.K. Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. **BMC Biotechnology**, v.9, p.1-11, 2009.

DAMIR, M. El. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium Anisopliae*. **Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.6, p.269-274, 2006.

EDGINGTON, S.; SEGURA, H.; LA ROSA, W.; WILLIAMS, T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. **International Journal of Pest Management**, London, v.46, p.169-176, 2000.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, New York, v.89, p.383-392, 1997.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v.135, p.171-181, 1996.

FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERT, D.W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. Isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.96, p.237-243, 2007.

FERRON, P. Fungal control. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.), **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon press, 1985. p313-346.

HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.5260-5266, 2005.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biologic Control**, Orlando, v.5, p.581-590, 1995.

JARONSKI, S.T. Commercial development of deuteromycetous fungi of arthropods: a critical appraisal. In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS, R. **Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology** (Ed.) Netherlands: Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, 1986. p.653-656.

KAMP, A.M.; BIDOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.74-77, 2002.

LATGÉ, J.P.; HALL, R.A.; CABRERA, R.I.; KERWIN, J.C. Liquid fermentation of entomopathogenic fungi. Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS, R. **Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology** (Ed.), Netherlands: Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, 1986. p.603-606.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto, 2003. 92p.

LOUREIRO, E. de S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. de; PESSOA, L.G.A. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, p.469-472, 2005.

LOUREIRO, E. de, MOINO JR, A. Patogenicidade de Fungos ifomicetos aos Pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.660-665, 2006.

MONTEIRO, A.C.; BARBOSA, C.C.; CORREIA, A. do C.B. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lenacii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.561-565, 2004.

NASCIMENTO, E.; SILVA, S.H da; MARQUES, E. dos R.; ROBERTS, D.W.; BRAGA, G.U.L. Quantification of Cyclobutane Pyrimidine Dimers Induced by UVB Radiation in Conidia of the Fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.20, p.1-8, 2010.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, p.77-82, 2005.

OLIVEIRA, R.C. de O.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, L.F.A. Seleção de Fungos Entomopatogênicos para o controle de *Oligonychus yothersi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, p.347-351, 2004.

QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Intra-specific variation in virulence and *in vitro* production macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of *in vivo* and *in vitro* passage on these factors. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.13, p.323-340, 2003.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.88, p.116-125, 2005.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.87, p.77-83, 2004.

REDDY, N.P.; KHAN, D.K.U.; VICTOR, J.S.; SHARMA, HC. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Pest Management. Science**, Sussex, v.64, p.909-915, 2008.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; BRESSAN, D.F.; NEVES, P.M.O.J.; SILVA, E.R.L.; ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de fungos para o controle do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.231-240, 2006.

SANTORO, P.H; NEVES, P.M.O.J; ALEXANDRE, T.M; SARTORI, D.; ALVES, L.F.A; FUNGARO, M.H Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.97, p.83-90, 2008.

SCULLY, L.R.; BIDOCHKA, M.J. Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.51, p.185-189, 2005.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na indústria. In: AZEVEDO, J.L. (Ed.). **O uso dos fungos na biotecnologia**, Guaíba: Agropecuária, p.93-152, 2001.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.251, p.259-266, 2005.

SONG, T.-T.; FENG, M.-G. *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.106, p.211-216, 2011.

STEINKRAUS, D.C.; GEDEN, C.J.; RUTZ, D.A. Susceptibility of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) to *Beauveria bassiana*: Effects of host stage, formulation, substrate and host passage. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.28, p.314-321, 1991.

VANDENBERG, J.D.; CANTONE, F.A. Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.85, p.40-45, 2004.

WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I.; BRADLEY, C.A.; JARONSKI, S.T.; LACEY, L.A.; WOOD, P.; GALAINI-WRAIGHT, S. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, p.217-226, 1998.

YAO, S.; YING, S.; FENG, M.; HATTING, J.L. In vitro and in vivo responses of fungal biocontrol agents to gradient doses of UV-B and UV-A irradiation. **BioControl**, Dordrecht, v.55, p.413-422, 2010.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.40, p.36-40, 1982.

7 CONCLUSÕES GERAIS

As condições nutricionais de cultivo de *B. bassiana* influenciam a qualidade dos propágulos produzidos meios que favorecem alta produção de conídios dão origem aos mais tolerantes à radiação UV e mais virulentos. Já a tolerância à temperatura é positivamente correlacionada com os teores de K, C e principalmente com a relação C:N endógena nos conídios. Entretanto, o aumento do teor de enxofre nos conídios influencia de maneira negativa a produção de conídios, a virulência e a tolerância à radiação UV.

Os cultivos sucessivos *in vitro* de *B. bassiana* reduzem o crescimento vegetativo e a produção de conídios, contudo, o meio MAD, constituído por insetos, favorece a manutenção destas características por um número maior de cultivos. Os conídios produzidos neste meio não apresentam alteração em sua virulência, mas tornam-se menos tolerantes a temperatura após cultivos sucessivos, ao contrario dos conídios produzidos em meio BDA. As características de virulência, produção de conídios e tolerância à temperatura, que são atenuadas pelos cultivos sucessivos, podem ser restauradas após a passagem do fungo pelo hospedeiro.

As passagens sucessivas de *B. bassiana* pelo hospedeiro, *A. diaperinus*, afetam o crescimento vegetativo, a produção de conídios, a virulência e a tolerância à temperatura e à radiação UV, com respostas diferentes entre os isolados. A produção de conídios em arroz é favorecida pelas passagens do fungo, com maior ou menor intensidade, dependendo do isolado. A virulência e a tolerância à temperatura apresentam incrementos superiores a 100% após a 15ª passagem do fungo pelo inseto, já a tolerância à radiação UV é afetada negativamente.