



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JANAINA ZORZETTI

**PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.)  
VUILL APÓS CULTIVOS SUCESSIVOS**

---

Londrina  
2012

JANAINA ZORZETTI

**PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.)  
VUILL APÓS CULTIVOS SUCESSIVOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira  
Janeiro Neves

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

Z88p Zorzetti, Janaina.  
Parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill após cultivos  
sucessivos / Janaina Zorzetti. – Londrina, 2012.  
86 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,  
2012.

Inclui bibliografia.

1. Fungos entomopatogênicos – Teses. 2. Inseto – Controle biológico  
– Teses. 3. Fungos – Virulência (Microbiologia) – Teses. 4. *Beauveria bassiana*  
– 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

JANAINA ZORZETTI

**PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL  
APÓS CULTIVOS SUCESSIVOS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dra. Maria Inês Rezende  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dra. Viviane Sandra Alves  
UENP – Cornélio Procópio – PR

---

Dra. Talita Moretto Alexandre  
UEL – Londrina – PR

---

Dra. Fabiane Cunha  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 15 de fevereiro de 2012.

## **DEDICATÓRIA**

A minha querida tia Nilde (*In memoriam*).  
Sua vida foi uma lição de bondade e dedicação não só  
para mim, mas para todos que tiveram o privilégio de  
sua companhia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder sabedoria e fortaleza, e por colocar em meu caminho tantas pessoas especiais e importantes para a conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves, pela orientação, amizade, apoio, paciência e pela tranquilidade transmitida nos momentos de preocupações.

A todos os professores do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pelos ensinamentos e amizade durante a graduação e o mestrado.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização do trabalho.

Às grandes amigas Patricia H. Santoro e Kelly Constanski, que me incentivaram a fazer o mestrado, e estiveram presente desde o surgimento da idéia deste trabalho, até a sua conclusão. Obrigada por toda ajuda, conselhos, por tantos momentos bons e pelas risadas e angustias compartilhadas. Sem vocês tudo seria mais difícil e sem graça.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia, Junio, Mylena, Paulo, Orcial, Mariana, Viviane, Camila, Mateus, Adriano por todo apoio e companheirismo.

À Prof. Dra. Inês Fonseca pelo auxílio nas análises estatísticas.

À professora Dra. Maria Inês Rezende, pela ajuda e amizade e por disponibilizar seu laboratório para as análises de proteases.

Ao Davi Tramontina, técnico do Lab. de Entomologia; 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.

À minha madrinha Sandra, e a todos os tios, tias e primos, que colaboraram e incentivaram a sempre buscar meus objetivos.

Aos meus pais, Odair e Amélia, pelo amor, paciência e confiança, e por nunca medirem esforços em minha formação, e a minha irmã Luciane e meu cunhado Fernando, pelo apoio e eterno exemplo de sabedoria, dedicação e persistência.

Ao meu sobrinho Pedro Fernando, com todo meu carinho, por me proporcionar alegria e descontração em meio a tantos momentos difíceis. Estarei sempre ao seu lado!

ZORZETTI, Janaina. **Parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill após cultivos sucessivos**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

A eficiência dos fungos entomopatogênicos pode ser alterada após sucessivos cultivos *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de sucessivos cultivos de isolados de *Beauveria bassiana*, *in vitro*, em diferentes condições nutricionais, sobre parâmetros biológicos como crescimento vegetativo e produção de conídios, virulência, tolerância à temperatura e à radiação UV, produção de conídios em arroz e sensibilidade ao fungicida azoxistrobina. Foram utilizados o meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para a Produção de Esporo de *Beauveria* spp.). O fungo foi inicialmente inoculado no hospedeiro, cultivado por 20 vezes nos diferentes meios, e novamente inoculado no inseto. Foram selecionados para os ensaios, os conídios de 1<sup>o</sup>(A), 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 1<sup>o</sup>(B) cultivos dos isolados CG 152 e Unioeste 40. Os cultivos sucessivos e as condições nutricionais do meio interferiram na qualidade do fungo, e os isolados mostraram comportamentos diferentes entre si. O CV (crescimento vegetativo) do isolado CG 152 não foi afetado após os cultivos em BDA, e em MPE houve um incremento após a segunda inoculação no hospedeiro. O isolado Unioeste 40 sofreu alterações após os sucessivos cultivos, e a inoculação no inseto proporcionou um aumento apenas em MPE. Não houve correlação entre CV e produção de conídios. O meio de cultivo onde ocorreram as sucessivas repicagens também interferiu na produção de conídios em arroz, sendo que os maiores valores foram obtidos para os cultivados em MPE. Os cultivos em meio BDA proporcionaram maior termotolerância ao Unioeste 40 em todos os cultivos, e ao CG 152 após as inoculações no hospedeiro. *B. bassiana* foi suscetível à radiação UV, e essa característica foi influenciada pelos cultivos sucessivos nos diferentes meios. O isolado CG 152 foi mais tolerante quando cultivado em MPE, e a inoculação no hospedeiro aumentou a tolerância a radiação UV para o Unioeste 40. A virulência do isolado Unioeste 40 a *A. diaperinus* foi atenuada após 10 cultivos em meio BDA, e não foi restaurada após a inoculação do fungo pelo hospedeiro. A sensibilidade de *B. bassiana* ao fungicida azoxistrobina foi afetada após os sucessivos cultivos. Os conídios originados em MPE foram mais resistentes, e a inoculação no hospedeiro também aumentou a tolerância ao fungicida. A redução do número de UFC para os conídios expostos ao fungicida foi menos acentuada que a redução na germinação, que pode indicar um atraso da germinação. Esses resultados mostram que é possível aprimorar a eficiência de fungos no controle de pragas, através da seleção de um isolado virulento, e manipulação de suas condições nutricionais durante o cultivo e da inoculação no hospedeiro.

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

ZORZETTI, Janaina. **Biological parameters of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill after successive subculture.** 2012. 87 f. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

The efficiency of entomopathogenic fungi can be changed after successive subculturing *in vitro*. The aim of this study was to evaluate the effect of successive subculturing of *B. bassiana in vitro*, under different nutritional conditions on biological parameters such as vegetative growth and conidial yield, virulence, tolerance to temperature and UV radiation, conidia production on rice and sensitivity to the fungicide azoxystrobin. PDA (Potato Dextrose, Ágar) and MPE (Medium for Spore Production of *Beauveria* spp.) medium were used. The fungus was initially subcultured in the insect, subcultured 20 times in different media, and again subcultured in the insect. Were selected for tests, conidia from 1°(A), 10°, 20° e 1°(B) cultivation of isolates CG 152 e Unioeste 40. Successive subculturing and nutritional conditions of the medium affected the fungus quality and the isolates showed different behaviors. The VG (vegetative growth) of the isolate CG 152 was not affected after subculture in BDA, and in MPE, there was an increase in VG after the second subculture in the host. The isolate Unioeste 40 was affected after successive subculture, and the subculture in the insect provided an increase only in MPE. There was no correlation between VG and conidia yield. The culture medium in which there were successive subcultures also interfered in the conidia production on rice, with the highest values obtained for cultured on MPE. The subculture in PDA medium resulted in greater thermotolerance to Unioeste 40 in all subcultures and CG 152 after the subculturing in the host. *B. bassiana* was susceptible to UV radiation, and this character was influenced by subculturing in different medias. The isolate CG 152 was more tolerant when subcultured in MPE, and the subculture in the host increased UV radiation tolerance for Unioeste 40. The virulence of the isolate Unioeste 40 to *A. diaperinus* was attenuated after 10 subcultures in PDA medium, and was not restored after the fungus subcultures in the host. The sensitivity of *B. bassiana* to the fungicide azoxystrobin was affected after the successive subcultures. The conidia originated in MPE were more resistant, and the subculture in the host also increased fungicide tolerance. Reducing the UFC number for conidia exposed to the fungicide was less pronounced than the germination reduction, which may indicate germination delayed. These results show that it is possible to improve fungus efficiency for pests control, through the selection of a virulent isolate, and manipulation of nutritional conditions during cultivation and the subculture in the host.

**Keywords:** Entomopathogenic fungus. Conidia yield. Tolerance to UV radiation. Tolerance to temperature. Virulence.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Crescimento vegetativo ( $\text{cm}^2$ ) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey  $p < 0,05$ ); CG 152 (CV=19,85 %), Unioeste 40 (CV= 9,70 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....39
- Figura 2** – Produção de conídios ( $\times 10^7$  conídios colônia<sup>-1</sup>) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey  $p < 0,05$ ); CG 152 (CV=47,40 %), Unioeste 40 (CV= 30,55 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....40
- Figura 3** – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* em arroz, inoculado com conídios provenientes de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), 15 dias após incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey  $p < 0,05$ ); CG 152 (CV=22,07 %), Unioeste 40 (CV= 50,34 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....43
- Figura 4** – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por *Beauveria bassiana* (CG 152) proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos); letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ), para mortalidade total (CV=35,04 %) e confirmada (CV=38,04 %). As mortalidades nas testemunhas, total (4 %) e confirmada (0 %), diferem dos demais tratamentos (Dunnett,  $p < 0,05$ );

	1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....	46
<b>Figura 5 –</b>	Mortalidade de <i>Alphitobius diaperinus</i> por <i>Beauveria bassiana</i> (Unioeste 40) proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos); letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey, $p < 0,05$ ), para mortalidade total (CV=24,59 %) e confirmada (CV=32,19 %). As mortalidades nas testemunhas, total (4,00%) e confirmada (0%), diferem dos demais tratamentos (Dunnett, $p < 0,05$ ); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....	47
<b>Figura 6 –</b>	Unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Beauveria bassiana</i> (CG 152), a partir de conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos à radiação ultravioleta por um minuto; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey, $p < 0,05$ ); Não expostos à radiação ultravioleta (CV= 15,07 %); Expostos à radiação ultravioleta (CV= 39,69 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.....	49
<b>Figura 7 –</b>	Unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Beauveria bassiana</i> , (Unioeste 40) a partir de conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos à radiação ultravioleta por um minuto; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey, $p < 0,05$ ); Não expostos à radiação ultravioleta (CV= 17,49 %); Expostos à radiação ultravioleta (CV= 58,34 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....	51

- Figura 8** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (CG 152), com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos a 30 °C por 15 dias; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Não expostos a 30°C (CV=8,53 %); Expostos a 30°C (CV=13,38 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....54
- Figura 9** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (Unioeste 40), com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos a 30 °C por 15 dias; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Não expostos a 30°C (CV=13,23 %); Expostos a 30 °C (CV=26,52 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.....55
- Figura 10** – Germinação de *Beauveria bassiana*, (CG 152), com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 4,16 %); Expostos ao fungicida (CV= 42,85 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro .....58
- Figura 11** – Germinação de *Beauveria bassiana*, (Unioeste 40), com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 4,44 %); Expostos ao fungicida (CV= 25,17 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a

passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.....59

**Figura 12** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, (CG 152), com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 11,35 %); Expostos ao fungicida (CV= 16,35 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro ..... 61

**Figura 13** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana*, (Unioeste 40), com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 14,90 %); Expostos ao fungicida (CV= 10,15 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro ..... 63

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	16
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1	CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS .....	17
3.1.1	Fungos Entomopatogênicos .....	19
3.2	FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA NO USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS .....	21
3.2.1	Produção de Fungos Entomopatogênicos.....	23
3.2.2	Cultivos Sucessivos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	25
3.2.3	Temperatura.....	27
3.2.4	Radiação Ultravioleta .....	30
3.2.5	Compatibilidade Química Entre Agrotóxicos e Fungos Entomopatogênicos.....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1	MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> .....	34
4.1.1	Cultivos Sucessivos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	34
4.2	CRESCIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS .....	35
4.3	PRODUÇÃO DE CONÍDIOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	35
4.4	AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA A <i>ALPHITOBIOUS DIAPERINUS</i> .....	36
4.5	TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV .....	36
4.6	TOLERÂNCIA À TEMPERATURA ELEVADA .....	37
4.7	COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE AZOXISTROBINA E <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> .....	37
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
5.1	CRESCIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS .....	39
5.2	PRODUÇÃO DE CONÍDIOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	43
5.3	AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA A <i>ALPHITOBIOUS DIAPERINUS</i> .....	45
5.4	TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV .....	49
5.5	TOLERÂNCIA À TEMPERATURA ELEVADA .....	53

5.6	COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE AZOXISTROBINA E <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> .....	57
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>67</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>79</b>
	APÊNDICE A – Figura 1 .....	80
	APÊNDICE B – Tabela 1.....	81
	APÊNDICE C – Tabela 2.....	82
	APÊNDICE D – Tabela 3.....	83
	APÊNDICE E – Tabela 4.....	84
	APÊNDICE F – Tabela 5.....	85
	APÊNDICE G – Tabela 6.....	86
	APÊNDICE H – Tabela 7.....	87

## 1 INTRODUÇÃO

O desequilíbrio ecológico é uma das consequências do modelo de agricultura praticado atualmente, que através de monocultivos e expansão das áreas cultivadas, favorecem o aumento de pragas e consequentemente o maior uso dos agrotóxicos, que quando aplicados em excesso causam danos ao homem e ao meio ambiente. 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.

Uma das ferramentas do controle biológico são os fungos entomopatogênicos, que são os agentes de controle microbiano mais utilizados na América Latina, sendo que *B. bassiana* representa mais de 33 % do total de fungos (FARIA; WRAIGHT, 2007). Sua utilização é promissora devido à grande versatilidade, pois causam danos aos artrópodes que vivem em plantas, solos e ambientes aquáticos, mantêm populações de parasitos, predadores e polinizadores (insetos não-alvo), sua penetração no hospedeiro é via tegumento, não poluem o ambiente, não são tóxicos para o homem e outros animais, podem ser cultivados *in vitro* e são disponíveis em formulações comerciais.

Para que estes agentes de controle 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. Para isso precisam ser produzidos em grande quantidade, mantendo as características produtivas e de virulência com custo acessível. Entretanto, a qualidade dos produtos à base de fungos entomopatogênicos comercializados no Brasil é bastante variável. Podem ser encontrados produtos excelentes com ótimos padrões de concentração, viabilidade, pureza e estabilidade genética do patógeno, e ao mesmo tempo, outros de baixa qualidade, sem padronização e com altos níveis de contaminação.

A produção em meio sólido, líquido e bifásico, descrita por Leite et al. (2003), inicia-se com a multiplicação dos conídios em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar). 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, 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., 2008a).

Alguns isolados apresentam características estáveis para a produção massal, como foi observado para *B. bassiana* em relação a *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), onde não foram observadas alterações morfológicas nos conídios nem redução

de virulência após 15 passagens sucessivas em SDY (Sabouraud, Dextrose, Ágar, Extrato de Levedura 0,1 %) (BROWNBRIDGE et al., 2001). Assim como para isolados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise), onde a virulência a *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Hemiptera: Aphididae) e *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) também não foi afetada após 30 cultivos consecutivos em meio SDY. Entretanto, para alguns dos isolados foi observada redução na produção e viabilidade dos conídios (VANDENBERG; CANTONE, 2004).

Fatores nutricionais no cultivo também podem afetar características dos entomopatógenos. Quesada-Moraga e Vey (2003) observaram que conídios de *B. bassiana* apresentaram redução na virulência a *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) após dois cultivos em meio SDA (Sabouraud, Dextrose, Ágar), e incremento após dois cultivos em meio MA (Malte, Ágar) ou após duas passagens pelo hospedeiro. O aumento da virulência de *B. bassiana* a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) foi observado com adição de insetos mortos no meio SDA, e esta característica se manteve após 15 cultivos nesse meio (GARCÍA et al., 2001).

Os eventos que levam a atenuação da virulência podem ser aleatórios (mutação) ou estão relacionados às condições de cultivo. Assim, 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.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de sucessivos cultivos *in vitro*, sobre parâmetros biológicos de *B. bassiana* nos meios BDA e MPE.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o crescimento vegetativo e produção de conídios;
- Determinar a produção de conídios em arroz;
- Verificar a manutenção da virulência;
- Determinar a tolerância a temperatura e à radiação UV;
- Avaliar a compatibilidade ao fungicida Azoxistrobina (Priori® 250g i.a/L);

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS

Na agricultura, grandes prejuízos são provocados por insetos-pragas que atuam em lavouras economicamente importantes. Isto se deve principalmente ao aumento do desequilíbrio ecológico provocado pelo homem, através da prática de monoculturas e a expansão das áreas cultivadas que contribuiu para o aumento do uso de agrotóxicos em todo o mundo. Estima-se que, das espécies de insetos conhecidas, cerca de 10 % sejam consideradas pragas da agricultura ou pragas urbanas (ALVES, 1998a).

O Brasil é considerado o maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo que, do total comercializado no país, os inseticidas correspondem a 30 %, e dos quais, 84 % estão inseridas nas Classes I (Produto Altamente Perigoso) e II (Muito Perigoso) (REBELO et al., 2010). A utilização excessiva de praguicidas de origem química sem prévia assistência técnica promove danos à produtividade, à natureza e ao ser humano. Esse fato pode ser comprovado por um estudo referente ao monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) onde, de 3.130 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).

Os problemas inerentes à inadequada utilização de agrotóxicos, principalmente sob o ponto de vista de resíduos e desequilíbrio ecológico, contribuíram para aumentar o interesse no manejo integrado de pragas (MIP), que se baseia na utilização de táticas que visam o aproveitamento do potencial de controle natural das pragas, como o controle biológico e o uso de práticas culturais adequadas evitando o crescimento de populações de pragas em níveis que causem danos econômicos (PEREIRA et al., 1998).

O controle biológico é uma das alternativas ao uso dos agrotóxicos, e 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 desses últimos agentes é denominada Controle Microbiano e estuda a patologia de insetos, bem como sua etiologia, sintomatologia e epizootiologia das doenças, com o objetivo de utilizá-las para o controle de pragas, ou evitá-las em populações de insetos úteis (ALVES, 1998a).

Os fungos são um dos os micro-organismos mais utilizados para o controle biológico de insetos-praga, e apesar de terem sido descobertos como patógenos de insetos há mais de 2000 anos, sua importância no controle microbiano de insetos só ocorreu a partir de 1835 com a atuação de Agostino Bassi (considerado o pai da patologia), quando demonstrou a patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o bicho-da-seda (ALVES, 1986), descobrindo que um micro-organismo era capaz de causar doença, e que essa podia ser transmitida de um indivíduo doente para outro sadio (FERREIRA; MARTINS, 1997).

Embora a descoberta de Bassi tenha ocorrido em 1835, apenas 35 anos depois é que o pesquisador russo, Elie Metschnikoff, realizou o primeiro estudo 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, os fungos entomopatogênicos, vêm sendo estudados desde 1923, quando Pestana identificou duas espécies de cigarrinhas infectadas por *M. anisopliae*, que ele chamou naquela ocasião de *Penicillium anisopliae*. O italiano Pietro Guagliumi realizou vários trabalhos de laboratório e de campo, a partir de 1955, sobre controle biológico de cigarrinhas da cana-de-açúcar e das pastagens por meio do fungo *M. anisopliae* (GUAGLIUMI, 1968). Depois disso, vários autores brasileiros passaram a avaliar a viabilidade do uso de fungos para o controle de diferentes espécies de insetos-praga. 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 relevância de pesquisas nessa área pode ser verificada pelo número de trabalhos desenvolvidos no país com entomopatógenos, que em sua maioria, destacam a eficiência desses micro-organismos em diversas culturas, além do aumento no número de projetos e de empresas que os produzem e comercializam (ALVES et al., 2008b).

Os fungos possuem algumas vantagens em relação ao controle químico, como a seletividade e especificidade, não afetando, portanto, outros insetos ecologicamente importantes. Além disso, ao contrário de outros entomopatógenos não necessitam ser ingeridos para que ocorra a infecção (ALVES, 1998a). 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 fungos 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 (LEITE et al., 2003).

Entre as desvantagens estão à ação mais lenta, a especificidade, necessidade de condições ambientais favoráveis como temperatura, umidade, luminosidade e radiação, maiores cuidados no armazenamento visando a manutenção da viabilidade e virulência, baixa persistência e os custos elevados em comparação com alguns agrotóxicos (LACEY et al., 2001). Outros fatores que podem também ser considerados como desvantagens são o planejamento das aplicações, observando-se o período de incubação do patógeno, de modo que o inseto possa ser eliminado antes de prejudicar economicamente a cultura e a necessidade de um conhecimento tecnológico para viabilizar a implementação, que pode ser dificultada especialmente pelo nível cultural do agricultor.

A utilização dos fungos entomopatogênicos no MIP, mesmo não sendo uma área de conhecimento recente, tomou grande impulso, principalmente após a proibição do uso dos inseticidas organoclorados e também em decorrência do estabelecimento do MIP como prática racional no controle de insetos-praga (MOINO JUNIOR, 2000). Entretanto, ainda são necessários estudos visando à 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).

### 3.1.1 Fungos Entomopatogênicos

Os fungos exercem a função de controle de insetos em ambientes naturais e ecossistemas agrícolas, ocupando um lugar relevante na manutenção do equilíbrio ecológico. Foram os primeiros patógenos utilizados no controle microbiano (ALVES, 1998a), e nos últimos anos, o seu uso vem se intensificando, com vantagens em muitas situações, em substituição aos produtos químicos (PEREIRA et al., 1998). 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 de insetos conhecidas têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes aos 90 gêneros e mais de 700 espécies (ALVES, 1998b). A maioria dos gêneros relatados ocorre no Brasil, e mais de 20 destes incidem sobre pragas de importância econômica. Dentre estes, destacam-se espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticilium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Askersonia* e *Entomophthora*. A ocorrência desses patógenos é relativamente comum, sendo um

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

Nos últimos anos os esforços de pesquisa e desenvolvimento tecnológico têm aumentado significativamente. No Brasil, até 2008, existiam cerca de dezenove empresas de biopesticidas privadas comercializando micoinseticidas (FARIA; WRAIGHT, 2007; ALVES et al., 2008c), que utilizam por volta de 12 espécies ou subespécies de fungos para aplicações inundativas e inoculativas. Do total dos produtos comercializados a base de fungo, os hifomicetos *B. bassiana* e *M. anisopliae* 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). A capacidade de produção e obtenção de formulados a partir da associação de *B. bassiana* a diferentes compostos o tornou um dos mais comercializados, obtendo 33,9 % do total de micoinseticidas desenvolvidos em nível mundial (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Alguns desses produtos a base de fungos são utilizados para controle de 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; JIN et al., 2008). A baixa especificidade para artrópodes também esta relacionada ao sistema de defesa destes insetos, que é incapaz de detectar os primeiros eventos relacionados à infecção desses patógenos (ALVES, 1998).

A maioria dos fungos é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem a outros patógenos que entram no inseto por via oral. Apresentam um complexo de enzimas que lhes permite penetrar o tegumento, colonizar a cavidade corporal utilizando a hemolinfa e os órgãos dos insetos como substrato alimentar e, posteriormente, exteriorizar-se, produzindo novos propágulos no cadáver, liberando-os no ambiente. O ciclo de infecção 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). Os fungos podem também infectar diferentes estágios de desenvolvimento, como ovos, larvas, pupas e adultos (ALVES, 1998b). A variabilidade genética desses entomopatógenos possibilita selecionar isolados altamente virulentos para um vasto espectro de hospedeiros.

O gênero *Beauveria*, propriamente dito, foi descrito em 1912 por Vuillemin e, a partir de caracteres morfológicos e bioquímicos, seis espécies foram identificadas: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* e *B. vermiconia* (MUGNAI et al.,

1989). É parasito de muitos artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos, principalmente Lepidoptera e Coleoptera (ALVES, 1998b). Além de ser o primeiro microorganismo 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 artificiais (LEITE et al., 2003).

A espécie *B. bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) é de ocorrência generalizada em todos os países, sendo a mais freqüente sobre insetos e amostras de solo, onde pode subsistir por longo tempo em saprogênese. É o entomopatógeno mais empregado como agente de controle microbiano no mundo (BUTT et al., 2001). Em condições de laboratório, pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que a campo ocorrem de forma enzoótica e epizoótica. A infecção ocorre naturalmente via tegumento, onde o fungo germina em doze a dezoito horas, dependendo da presença de nutrientes, como por exemplo, glicose, quitina e nitrogênio, entre outros (ALVES, 1998). Decorridas 72 horas 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 é observada a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios, dando início a um novo ciclo (ALVES, 1998b).

*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).

Alguns compostos antimicrobianos, como a lisozina e peptídeos antimicrobianos, foram identificados em *B. bassiana* como defesa contra a microflora endógena do hospedeiro ou colonizadores secundários, facilitando sua sobrevivência e colonização do patógeno (CHO et al., 2006).

### 3.2 FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA NO USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Vários fatores influenciam o sucesso do uso de fungos no controle microbiano. É necessário que haja condições ambientais favoráveis para que sejam eficientes, pois a atividade fúngica é fortemente influenciada pelas condições bióticas e abióticas (PELL et al., 2001). Para um controle efetivo, os conídios, que são as unidades infectantes, devem possuir alta viabilidade e virulência contra o inseto-praga, pois ainda que sejam capazes de aderir à cutícula do inseto, podem não germinar por alguns motivos, incluindo as condições

ambientais de baixa umidade ou a presença de fatores na cutícula que inibem a ação do patógeno (BOUCIAS; PENDLAND, 1998).

A patogenicidade de um fungo é normalmente multifatorial, e depende de uma série de elementos que podem ditar o sucesso no desenvolvimento da doença dentro do hospedeiro, como a produção de toxinas e de exoenzimas (St. LEGER et al., 1998). A virulência compreende a gravidade dos sintomas da doença no hospedeiro infectado. Nos micro-organismos patogênicos, os fatores de virulência estão envolvidos nos vários estágios de desenvolvimento da doença (THOMAS; ELKINTON, 2004), e assim como a viabilidade, também devem ser mantidos, mesmo após certo período de estocagem do fungo, para que esse seja considerado um agente de controle microbiano efetivo (JONES; BURGESS, 1998). Uma importante questão é que não só a virulência do patógeno, mas também a sobrevivência fora do hospedeiro e a capacidade de dispersão no ambiente são fatores cruciais para execução do biocontrole (BIDOCHKA et al., 2001). No entanto, após aplicação no campo o fungo estará exposto a condições ambientais que muito diferem daquelas encontradas por populações naturais (BRAGA et al., 2001a).

Em condições de campo, a eficácia de inseticidas biológicos se reduz de modo acentuado, já que o processo patogênico depende de uma série de fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, exposição à radiação solar direta, principalmente aos raios ultravioletas, saturação de água e outros (REIS et al., 2005). 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).

Devido à segurança atribuída aos fungos entomopatogênicos, especialmente em relação aos animais homeotérmicos (CRAWFORD et al., 1998), maiores conhecimentos acerca dos fatores de virulência permitirão o desenvolvimento de novas metodologias de cultivo e aplicação, com a finalidade de elevar as taxas de mortalidade associadas aos mesmos e reduzir a utilização de controladores químicos, diretamente nocivos tanto para os animais quanto para o ambiente.

### 3.2.1 Produção de Fungos Entomopatogênicos

Para serem utilizados no controle microbiano como inseticidas, os fungos entomopatogênicos precisam estar disponíveis em grande quantidade, pois a maioria dos programas de controle microbiano com fungos utiliza estratégias de incremento e introdução inundativa, nas quais o patógeno é aplicado em concentrações relativamente elevadas, na forma de um produto microbiano (micoInseticidas). As técnicas de produção massal desses controladores biológicos, a otimização dos processos de aplicação e o melhoramento genético dos micro-organismos empregados, tornando-os mais eficientes, vêm sendo desenvolvidos em laboratórios de todo o mundo (LEITE et al., 2003).

Essa produção 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). Geralmente, os conídios produzidos em substratos sólidos tendem a ser mais tolerantes a dissecações e mais estáveis em ambientes secos, comparados àqueles produzidos em meio líquido, pois a maioria dos fungos, realiza a conidiogênese em substratos sólidos, além de serem facilmente armazenados em laboratório (JACKSON, 1996).

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 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). Dependendo do meio em que germinam, diferentes isolados de uma mesma espécie podem se comportar de maneira diferente quanto à germinação (FRANCISCO et al., 2006).

Fatores como viabilidade, virulência, esporulação, desenvolvimento apressorial, crescimento vegetativo, conidiogênese, capacidade de sobreviver a condições adversas de umidade, luz (raios ultravioleta), temperatura e até a estabilidade do produto formulado com conídios, são alguns dos aspectos influenciados pelo meio de cultura e condições de cultivo na produção do fungo (ALVES et al., 1998).

Entre os trabalhos 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 e é necessário para suportar o desenvolvimento hifal após o início do processo de infecção. A composição dos conídios também pode apresentar diferenças quanto ao meio onde foram produzidos, sendo a maior relação C:N observada em conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* provenientes do meio que também continham uma maior relação dos elementos (SAFAVI et al., 2007). Além da relação C:N, uma diversidade de fontes e elementos químicos 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 biomassa fúngica produzida, pois pode influenciar o tipo, formato, quantidade do propágulo produzido, além de sua estabilidade após secagem e sua virulência (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, SDAY (Sabouraud, Dextrose, Ágar, Extrato de levedura) (ALVES et al., 1998) e MC (Meio Completo) (PONTECORVO et al., 1953). Enquanto que os meios Ágar-Água e Meio Mínimo que são nutricionalmente mais pobres, promoveram uma menor porcentagem de germinação. Entretanto, alguns isolados apresentaram boa germinação também nos meios com menor quantidade de nutrientes, talvez seja pelo fato de possuírem uma boa reserva endógena de nutrientes (PONTECORVO et al., 1953).

Meios de cultivo mais pobre favorecem a esporulação, e os mais complexos estimulam o crescimento micelial e geralmente dão origem a conídios com menor virulência. 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. Essa influência do meio também foi observada por Safavi et al. (2007) onde maior taxa de germinação e menor tempo letal para larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae) foram obtidos de conídios de *B. Bassiana* provenientes do meio de cultivo responsável pelo baixo crescimento vegetativo e esporulação.

### 3.2.2 Cultivos Sucessivos *in vivo* e *in vitro*

O incremento da virulência é a principal característica para o bom desempenho de um fungo entomopatogênico, sendo necessário, manipular adequadamente por meio de métodos genéticos, físicos, químicos ou biológicos, para conservá-la ou melhorá-la. Dentre esses métodos, recomendam-se passagens sucessivas dos fungos pelos seus hospedeiros, o que pode alterar, além da virulência, as características morfológicas, a viabilidade, a esporulação e a composição química endógena dos conídios (ALVES; PEREIRA, 1998; SERAFINI et al., 2001).

Em alguns casos, foi demonstrado o restabelecimento e um aumento da virulência de alguns isolados após a passagem pelo hospedeiro. Como foi observado para o fungo *M. anisopliae*, que após passagem por larvas de *Culex pipiens* L., 1758. (Diptera: Culicidae), obteve acréscimo na virulência. Tal aumento permaneceu estável, mesmo após algumas inoculações em meios de cultura artificiais (DAOUST; ROBERTS, 1982). Alves et al (2002) atestaram a eficiência de *B. bassiana* em meio BDA, sugerindo que a viabilidade e virulência podem ser alteradas após passagem pelo hospedeiro. Alterações morfológicas das colônias e taxa de crescimento de um fungo entomopatogênico após passagens em meio artificial, foram revertidas após uma única passagem pelo hospedeiro (KAWAKAMI, 1960). Repicagens seriadas de fungo Hyphomycetes têm demonstrado afetar a virulência, mas a passagem pelo hospedeiro pode melhorá-la (FERRON, 1985).

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, observou-se redução na virulência para *D. noxia* após a passagem do fungo por 15 vezes em *P. xylostella*. Não houve recuperação da virulência mesmo após cinco novas passagens do fungo por *D. noxia*. Porém, o isolado 4491 recuperou a virulência após as cinco passagens em *D. noxia* (VANDENBERG; CANTONE, 2004).

Aumento na virulência também foi verificado para *M. anisopliae* após passagens sucessivas pelo hospedeiro *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). As alterações ocorreram a partir da 4ª passagem, sendo mais pronunciado na 7ª (ADAMES et al., 2010). Já Latch (1976) não observou incremento na virulência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* após passagem dos fungos sobre o inseto hospedeiro. 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.

Além da virulência, a composição química dos conídios 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). Alterações genéticas também podem ocorrer em uma população do patógeno após passagens pelo hospedeiro, como aconteceu para um isolado de *Aspergillus flavus* (Lik) que teve redução da sua diversidade genética, após passagens sucessivas por *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae), o qual, neste caso, serviu como um gargalo genético (SCULLY; BIDOCHKA, 2006).

Entre as causas das alterações na virulência dos fungos em relação ao inseto hospedeiro podem estar à produção de proteases e 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 estar relacionado a atividade da protease Pr1, que obteve um significativo acréscimo, assim como a hidrofobicidade dos conídios, os quais estão correlacionadas com a capacidade de adesão (SONG; FENG, 2011).

Os efeitos de sucessivas passagens *in vitro* nas características morfológicas e de virulência de fungos entomopatogênicos é bastante variável entre isolados e espécies, e a manutenção desses atributos é desejável para um agente de controle biológico produzido em massa (VANDENBERG; CANTONE, 2004). De maneira geral os fungos entomopatogênicos podem ser facilmente cultivados em meio artificial (FERRON, 1985), 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 são preservadas durante o processo de produção em larga escala, onde o patógeno é cultivado por vários e sucessivos ciclos em meio de cultivo.

É necessário identificar condições de cultivo que retenham a virulência, sem aumentar os custos de produção (BUTT; COPPING, 2000). Os meios naturais complexos podem evitar a seleção de mutantes nutricionais menos patogênicos, muito comum quando se utilizam meios artificiais (PEREIRA; EIRA, 1999). No entanto, ainda faltam esclarecimentos nesta área, em parte porque os mecanismos de redução da virulência não foram demonstrados. 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.

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). O mesmo ocorreu com dois isolados de *M. anisopliae* a *T. molitor*, onde a virulência, 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 V275 e V245, respectivamente (SHAH et al., 2007).

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). Alguns estudos indicam a perda de patogenicidade de isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. Rileyi*, *P. farinosus* e *V. Lecanii* (KAWAKAMI, 1960; MORROW et al., 1989), entretanto outros isolados conservaram a virulência após as repicagens (HALL, 1980; HAYDEN et al., 1992). Para *P. farinosus*, nenhuma perda de virulência ocorreu após 15 sucessivas passagens *in vitro* (HAYDEN et al., 1992).

Não foram observadas 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 (BROWNBRIDGE et al., 2001). A passagem *in vitro* de *P. fumosoroseus*, por 30 vezes 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 observada 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).

### 3.2.3 Temperatura

As condições ambientais influenciam a eficácia dos fungos entomopatogênicos no campo, sendo a temperatura uma das mais importantes (ROBERTS;

CAMPBELL, 1977), pois afeta o metabolismo, alterando os processos de produção de enzimas, toxinas, germinação dos esporos, desenvolvimento do tubo germinativo, penetração, colonização e reprodução (ALVES; LEUCONA, 1998). Esse fato torna-se ainda mais importante, tendo em vista a incapacidade dos patógenos de se protegerem das variações de temperatura através de sistemas fisiológicos (ALVES, 1998b).

Elevadas temperaturas podem afetar as células de diferentes formas quando o calor é acompanhado por elevada umidade e provocar, por exemplo, a desnaturação de proteínas e a desorganização de membrana (SETLOW; SETLOW, 1995). A exposição ao calor em baixa umidade causa danos ao DNA através da perda de bases e leva a depurinação (SETLOW; SETLOW, 1996). Também foi observado que o crescimento radial dos isolados diminui de acordo com o aumento da temperatura (POLAR et al., 2005).

As exigências térmicas dos fungos são variáveis em função da espécie, raça e fase de desenvolvimento (ALVES; LECUONA, 1998). No solo, a temperatura e umidade ideal para a persistência de alguns fungos entomopatogênicos também pode variar de acordo com a linhagem. As condições de baixa ou média temperatura e umidade do solo favorecem a sobrevivência dos conídios (KESSLER et al., 2003).

A maioria dos fungos entomopatogênicos é considerada mesofílica por desenvolvem-se entre as temperaturas de 10 – 40 °C, e consideradas como ótimas as temperaturas entre 25 – 35 °C (COONEY; EMERSON, 1964). Altas temperaturas 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). A temperatura ótima observada para germinação e crescimento micelial de *M. anisopliae* foi 25 °C para todos os isolados analisados. No entanto, ensaios de patogenicidade com moscas das frutas mostraram que os isolados foram mais efetivos nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C do que aos 20 °C, e o tempo letal (TL<sub>90</sub>) diminuiu com o aumento da temperatura até a temperatura limite de 30 °C (DIMBI et al. 2004).

O fungo *B. bassiana* desenvolve-se em uma amplitude considerável de temperaturas que varia de 8 a 35 °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). Alguns isolados de *B. bassiana* foram testados quanto à habilidade de germinar e crescer em condições de temperatura similares às encontradas no ambiente de zonas tropicais. A temperatura de 25 °C foi relatada como ótima para *B. bassiana* e ciclos de 32 °C por 8 h e 25 °C por 16 h promoveram mais de 90 % de crescimento relativo em todos os isolados. Ciclos

com temperatura maior que 32 °C por 8 h de duração promoveram atraso e/ou diminuição da germinação em alguns isolados (DEVI et al., 2005). Em contrapartida, os processos celulares tornam-se significativamente menos ativos quando a temperatura é reduzida, o que é manifestado pela interrupção do crescimento e diminuição da atividade enzimática, e possivelmente por afetar o transporte ou a integridade da membrana celular (MAGAN, 1997).

Sabe-se que os isolados de fungos entomopatogênicos são expostos ao estresse térmico não somente pelas condições ambientais, mas também por aquelas estabelecidas através da termorregulação do hospedeiro. Alguns insetos, como os gafanhotos, podem elevar sua temperatura corporal através da seleção de habitat ou expondo-se ao sol (HEINRICH, 1993), e possivelmente, cenários como estes foram capazes de selecionar isolados de *B. bassiana* mais adaptados a altas temperaturas em regiões temperadas (FARGUES et al., 1997).

Em geral, isolados coletados em maiores latitudes demonstraram maior susceptibilidade ao calor do que isolados originados próximos à linha do equador. 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 (RANGEL et al., 2005). 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).

A variabilidade genética é importante para a adaptação dos fungos entomopatogênicos às diferentes regiões climáticas. Existe variabilidade significativa entre os isolados de *B. bassiana* difundidos pelo mundo inteiro em relação ao crescimento sob diferentes temperaturas. A ampla variação na tolerância ao calor proporciona a esta espécie notável adaptação a condições de grande flutuação térmica (FARGUES et al., 1997).

A temperatura afeta a persistência dos conídios e a mortalidade de insetos subterrâneos expostos a fungos (RATH, 2002). Temperaturas entre 20 e 25 °C e alto conteúdo de argila no solo tiveram efeito positivo na ocorrência e densidade de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, enquanto temperatura acima de 27 °C teve efeito negativo (KESSLER et al., 2003). Lanza et al. (2009) observaram redução na sobrevivência de *M. anisopliae* inoculado em solo e mantido a 31,5 ± 0,5 °C, com declínio acentuado após 100 dias. Ekesi et al. (2003) demonstraram que tanto a temperatura, quanto a umidade influenciaram a sobrevivência e infectividade de *M. anisopliae* para quatro espécies de mosca-das-frutas do gênero *Ceratitis*.

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.

Os danos causados aos conídios pela exposição ao calor por condução no solo ou por radiação direta, associado com a radiação ultravioleta, contribui para falhas em programas de controle biológico de insetos, no entanto, a seleção de isolados termo-tolerantes ajudaria a melhorar a eficácia dos fungos (RANGEL et al., 2005). Para tanto, a eficiência de um isolado de fungo deve considerar, além de sua virulência, sua capacidade de adequação ao ambiente do hospedeiro alvo (SMITS et al., 2003).

### 3.2.4 Radiação Ultravioleta

A radiação solar emite ondas na região da luz visível (400 a 700 nm), do infravermelho (1 mm a 700 nm), e do ultravioleta (UV-A 320 a 400nm, e UV-B 280 a 320 nm) sendo essa, considerada o principal agente de inibição dos entomopatógenos (ALVES; LECUONA, 1998). Os danos e a total inativação causados aos conídios pela radiação UV têm sido freqüentemente apontados como fator capaz de reduzir a eficiência de fungos em programas de controle biológico, e entre os fatores abióticos, é o mais importante (BRAGA et al., 2001a). Isso ocorre porque a exposição à radiação pode causar danos às macromoléculas, como o DNA, as proteínas, as biomembranas, ao RNA e aos ribossomos causando atraso na germinação, inativação de conídios e, conseqüentemente, redução da atividade inseticida (RANGEL et al., 2006; CHELICO; KHACHATOURIANS, 2007).

Alguns isolados apresentam extensa variação na tolerância quando expostos a luz solar total, sendo que um período de quatro horas de exposição à radiação ultravioleta, é capaz de reduzir a viabilidade de alguns isolados de *M. anisopliae* em até 100 %. Para os conídios que sobrevivem após a exposição à radiação UV, pode ocorrer um atraso da germinação (BRAGA et al., 2001b). 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).

A tolerância à radiação UV é variável entre as espécies de fungos entomopatogênicos. Foi identificada diversidade genética quanto à resistência à UV-B entre isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* expostos a uma fonte artificial de radiação (FERNANDES et al., 2007). 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). É possível que haja uma associação entre o grau de resistência à radiação e a origem geográfica dos isolados, já que isolados oriundos de latitudes mais baixas apresentaram menor suscetibilidade à exposição (BRAGA et al., 2001a; FERNANDES et al., 2007).

Sendo assim, estudos têm objetivado a seleção de isolados mais tolerantes à UV e a adição de fotoprotetores nas formulações usadas como inóculo, o que pode prolongar significativamente a persistência desses fungos em ambientes onde ficam expostos a luz solar (ROBERTS; CAMPBELL, 1977; FARGUES et al., 1988).

Existe a possibilidade de se promover uma maior resistência dos conídios à UV-B utilizando-se algumas ferramentas durante as fases de crescimento e esporulação. A exposição a estresse ambiental sub-letal ou a estresse nutricional, aparentemente, pode levar a produção de conídios com maior resistência à UV-B, fenômeno conhecido como proteção cruzada (RANGEL et al., 2008).

O desenvolvimento em diferentes fontes de nutrientes afeta tanto a resistência à UV-B quanto a velocidade de germinação dos conídios, entre outras variáveis. Conídios produzidos em meios de cultivo não preferidos pelos fungos apresentaram maior resistência à exposição UV-B, quando comparados ao crescimento em meios ricos ou aos conídios obtidos em cadáveres dos insetos (RANGEL et al, 2008) indicando que o uso destas variáveis durante o processo de produção dos conídios pode afetar sua eficácia no campo. Alguns 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 e formulações capazes de intensificar a tolerância dos conídios à radiação ultravioleta (INGLIS et al., 1995; LELAND; BEHLE, 2005).

### 3.2.5 Compatibilidade Química Entre Agrotóxicos e Fungos Entomopatogênicos

O método mais amplamente usado no Brasil para o controle de pragas é a aplicação de produtos químicos de largo espectro. Isto provoca uma alteração nas interações entre as espécies levando ao rompimento de cadeias tróficas e impossibilitando o controle biológico natural (BARBOSA, 1998). Alguns desses produtos também podem influenciar os fungos entomopatogênicos, afetando o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação, ou até mesmo a composição genética, alterando a sua virulência (ALVES et al., 1998a).

De acordo com Alves et al. (1998), o controle integrado com a utilização de produtos fitossanitários seletivos aos agentes de controle biológico pode ser uma das estratégias mais seguras e eficientes, principalmente nas culturas onde a utilização destes produtos seja indispensável, como as frutíferas de clima temperado, citros, café, algodão, soja, dentre outras. Além disso, existem evidências de que produtos fitossanitários utilizados na proteção das culturas podem ter efeitos antagônicos, nulos ou sinérgicos sobre a atividade inseticida/acaricida dos entomopatógenos presentes no agroecossistema (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 2003), permitindo o uso em conjunto quando o efeito for nulo ou sinérgico.

O efeito da aplicação desses pesticidas sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas. Normalmente, os fungicidas de um mesmo grupo químico, possuem modo de ação similar, (BERG, 1986), mas seus efeitos sobre os entomopatógenos podem variar conforme o isolado utilizado. Shapiro-Ilan et al. (2002) testaram a resistência de sete isolados de *B. bassiana* a fenbuconazole, e observaram que seis foram menos suscetíveis e um isolado foi fortemente inibido pelo produto. Loureiro et al. (2002) avaliaram sete fungicidas sobre *B. bassiana*, e todos foram muito tóxicos ao entomopatógeno, e ainda cinco desses produtos, foram tóxicos para *M. anisopliae*. A variabilidade genética natural entre isolados de uma mesma espécie de fungo entomopatogênico é bastante conhecida e amplamente relatada na literatura para diversos parâmetros biológicos, inclusive para a sensibilidade a produtos químicos sintéticos (PACCOLA-MEIRELES; AZEVEDO, 1991; LIU et al., 1993). Essa característica tem sido utilizada por Todorova et al., (1998) para explicar, em parte, as diferentes respostas de *B. bassiana* na presença de um mesmo produto químico.

Alguns fungicidas podem apresentar diferenças quanto a compatibilidade aos fungos, e os efeitos em seu desenvolvimento. Experimentos *in vitro* demonstraram que bitertanol, um triazol foliar, foi menos nocivo (HASSAN et al, 1991), enquanto triadimefon, outro triazol, reduziu o crescimento vegetativo de *B. bassiana* na dose recomendada a campo (MAJCHROWICZ; POPRAWSKI, 1993). Da mesma forma, miclobutanil (triazol), inibiu completamente a germinação de conídios, e reduziu fortemente o crescimento micelial quando testado *in vitro* nas doses recomendadas a campo. Já o fungicida azoxystrobin (estrubirulina), considerado como altamente inibitório na germinação dos fungos, dado seu modo de ação, foi menos prejudicial à germinação de *B. bassiana*. (SHAH et al., 2009). Tamai et al. (2002) observaram que inseticidas sintéticos de diferentes fabricantes, com a mesma composição de ingredientes ativos, levaram a diferença na toxicidade para *B.*

*bassiana*, fato que, segundo os autores, não se deve à concentração do princípio ativo, mas sim a outros constituintes de cada formulação.

Moino Jr. et al. (1989) avaliaram a ação de produtos fitossanitários utilizados na cultura do citros sobre *V. lecanii*, *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo que, em alguns tratamentos, ocorreu a diminuição do diâmetro médio das colônias, sem alteração no número de conídios produzidos. Esse comportamento pode ser explicado através de um mecanismo fisiológico de resistência do fungo, que pode metabolizar os princípios tóxicos das substâncias químicas ativas, usando as moléculas resultantes deste processo e lançando-as no meio de cultura como nutrientes secundários que estimularam a esporulação dos entomopatógenos. Ainda, outra possibilidade é que o fungo, em uma atividade comparável ao que ocorre com outros organismos vivos, usa seu esforço reprodutivo sob a presença de um composto tóxico que prejudica o seu desenvolvimento, resultando em maior crescimento vegetativo e gênese de conídios. Sendo assim, é necessária a utilização de produtos seletivos que não afetem o equilíbrio entre as pragas e seus predadores, parasitos e patógenos, responsáveis pelo controle biológico natural, que mantém as pragas em níveis populacionais aceitáveis.

Existem várias técnicas utilizadas nos estudos de compatibilidade entre produtos químicos e fungos entomopatogênicos, e geralmente diferem muito entre si, principalmente no método de contato entre o fungo e o produto, nas doses utilizadas e nos parâmetros avaliados, dificultando a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos. Muitos trabalhos levam em consideração apenas a influência dos produtos no crescimento vegetativo e esporulação, desconsiderando a germinação. No entanto, Neves et al. (2001) apontaram a importância da germinação de conídios nos estudos de compatibilidade, visto que a inibição dessa etapa inicial pode afetar o desenvolvimento normal do fungo no campo.

Os resultados divergentes obtidos nos estudos sobre a influência dos sucessivos cultivos em características de fungos entomopatogênicos podem estar envolvidos às variações intra e interespecíficas, uso de culturas monospóricas e condições nutricionais de cultivo. Assim antes de iniciar uma produção em larga escala, é necessário avaliar o efeito dos cultivos *in vitro* em diferentes condições nutricionais sobre parâmetros biológicos do isolado a ser cultivado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DE *BEAUVERIA BASSIANA*

Os isolados multiespóricos de *B. bassiana* utilizados foram Unioeste 40 e CG 152, previamente selecionados para controle de *Alphitobius diaperinus*, sobre o qual apresentaram diferentes níveis de virulência (SANTORO et al., 2008). As cepas encontram-se armazenadas na Coleção de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Estadual de Londrina. Os insetos adultos, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) foram coletados em aviários situados em Londrina, PR.

Inicialmente os conídios foram multiplicados em placas de Petri com meio específico para a produção de esporos de *Beauveria* spp. (MPE) (ALVES et al., 1998). Essas placas foram incubadas em câmara climatizada ( $25\pm 1$  °C e fotofase de 12 h) por 10 dias. Os conídios produzidos na superfície do meio foram inoculados em insetos 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 contendo  $1,0\times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> por 15 s. Logo após, os insetos foram acondicionados em placa de Petri (9 cm de diâmetro), alimentados com ração de milho esterilizada e mantidos em câmara climatizada ( $25\pm 1$  °C, 12 h de fotofase). Após a morte, os insetos foram novamente desinfetados e acondicionados em câmara úmida ( $25\pm 1$  °C) por cinco dias para a confirmação da mortalidade pelo fungo. Esses insetos foram então utilizados para a etapa seguinte (Apêndice A).

#### 4.1.1 Cultivos Sucessivos *in vivo* e *in vitro*

Após o desenvolvimento de *B. bassiana* sobre os insetos mortos (1°-inseto), os conídios foram coletados e multiplicados nos meios BDA e MPE e acondicionados em câmara climatizada ( $25\pm 1$  °C) por 10 dias, dando origem aos conídios de primeiro cultivo 1°(A), os quais foram novamente multiplicados nos respectivos meios, dando origem aos de 2° cultivo, e assim sucessivamente até o 20° cultivo. Esses conídios, designados como 20°, foram novamente inoculados em *A. diaperinus*. Após a morte do inseto (2°-inseto) e exteriorização do fungo produzido sobre os cadáveres, os conídios foram multiplicados nos meios de origem (BDA ou MPE), produzindo novamente conídios de primeiro cultivo, chamados de 1°(B).

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 250 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, 9°, 19° e 2°-inseto durante todo o experimento, foram novamente multiplicados em seus respectivos meios (BDA ou MPE), dando origem aos conídios de 1°(A), 10°, 20° e 1°(B) cultivo, respectivamente. Os conídios de cada um desses cultivos foram multiplicados em 25 placas, cada um em seu respectivo meio, a fim de se obter conídios suficientes para serem utilizados posteriormente nos bioensaios (Apêndice A).

#### 4.2 CRESCIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

Para avaliar o crescimento vegetativo e a produção de conídios, os conídios de cada uma das amostras foram inoculados no centro de uma placa de Petri (9 cm Ø) contendo MPE com o auxílio de uma agulha de platina. As placas foram então incubadas em câmara climatizada (25±1 °C e fotofase de 12 h) por 10 dias. O crescimento vegetativo correspondeu à área da colônia, calculada com a média dos diâmetros opostos. Das mesmas colônias avaliou-se a produção de conídios, os quais 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. Foram realizadas cinco repetições para cada cultivo.

#### 4.3 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Para a produção de conídios por fermentação em estado sólido utilizando arroz como substrato, foram adicionados, em 1 litro de água destilada em ponto de ebulição, 500g de arroz parboilizado, que foi cozido por três minutos no aparelho microondas em potência máxima, tempo suficiente para que os grãos atingissem uma consistência “emborrachada”. Através de uma peneira, a água não absorvida pelo arroz foi escoada e 65 g do arroz foram transferidos para garrafas de vidro de 500 mL devidamente tampadas com papel toalha 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  $1,0 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e incubadas em câmara climatizada ( $25 \pm 1$  °C e fotofase de 12 h) por 15 dias. Após esse período a produção de conídios foi avaliada adicionando-se 300 mL de uma solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v/v) a cada garrafa, que foram submetidas à agitação manual por três minutos. Após a etapa de homogeneização, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Foram realizadas quatro repetições para cada cultivo.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA A *ALPHITOBIOUS DIAPERINUS*

Para avaliar a virulência, 50 insetos adultos de *A. diaperinus* foram colocados em placa de acrílico (6 cm Ø) e pulverizados (pulverizador Airbrush acoplado a um compressor/aspirador Fanem-DiaPump) com 0,5 mL de uma suspensão de  $8 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , que corresponde a  $\text{CL}_{50}$  do isolado Unioeste 4, estimada para a praga por esse método (SANTORO et al., 2007). A testemunha foi pulverizada apenas 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 ( $25 \pm 1$  °C e fotofase de 12 h). A avaliação foi realizada ao 10º dia, quando os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida climatizada ( $25 \pm 1$  °C) por mais cinco dias, para confirmar a infecção pelo patógeno. Foram realizadas seis repetições de 50 insetos para cada cultivo, mais uma testemunha sem o contato com o fungo.

#### 4.5 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV

A sensibilidade dos conídios à radiação UV foi avaliada pela quantificação de UFC, pois ainda que o método mais utilizado seja a germinação após a exposição (BRAGA et al., 2002; FARGUES et al., 1996; MOORE et al., 1993; ZIMMERMANN, 1982), os resultados obtidos poderiam ser subestimados, já que a exposição à radiação pode causar apenas um atraso na germinação dos conídios sobreviventes (NASCIMENTO, 2010).

Assim, sobre a superfície do meio MPE foi inoculado 0,1 ml de uma suspensão com  $1 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  com alça de Drigalski. 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 a exposição à radiação UV por um minuto, e a não exposição, todas as placas foram fechadas e transferidas para câmara

climatizada ( $25 \pm 1$  °C e fotofase de 12 h). O número de colônias formadas foi avaliado após quatro dias. Foram realizadas seis repetições para cada cultivo.

#### 4.6 TOLERÂNCIA À TEMPERATURA ELEVADA

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 unidades formadoras de colônias (UFC), como descrito no tópico 4.5. Foram realizadas cinco repetições para cada cultivo.

#### 4.7 COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE AZOXISTROBINA E *BEAUVEIRA BASSIANA*

Avaliou-se a compatibilidade entre os conídios dos sucessivos cultivos de *B. bassiana* e o fungicida Azoxistrobina (Priori® 250 g i.a/L). Esse fungicida foi selecionado para os testes de compatibilidade por apresentar seletividade a alguns isolados de *B. bassiana* (CAVAGUCHI, 2008), e o objetivo era avaliar alterações na seletividade após os sucessivos cultivos. Para isso, foi preparada uma solução na concentração de 0,1 mL/L do fungicida em água destilada. As variáveis avaliadas foram: germinação dos conídios e UFC. Para o teste de germinação, foram utilizadas placas de Petri contendo meio MPE onde foi aplicado 0,1 mL da solução com fungicida. Após a secagem da solução, foi inoculado 0,1 mL de uma suspensão do fungo ( $1 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>) com alça de Drigalski. Após 20 horas (25 °C) observou-se, em microscópio óptico (40x), um campo com aproximadamente 200 conídios subdivididos em duas regiões da placa, quantificando os germinados e não germinados. Para determinar as UFC, inoculou-se 0,1 mL da suspensão de conídios ( $1 \times 10^3$  conídios mL<sup>-1</sup>) sobre o meio MPE tratado com a solução fungicida. As avaliações foram após quatro dias, quantificando-se as colônias formadas. Foram utilizadas seis placas (repetições) por tratamento. Para as testemunhas, foram preparadas placas inoculadas apenas com as suspensões de conídios, sem a presença do fungicida.

#### 4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para todos os experimentos realizados foram utilizados delineamentos experimentais inteiramente casualizado em esquema fatorial (2×4) (meios de origem dos

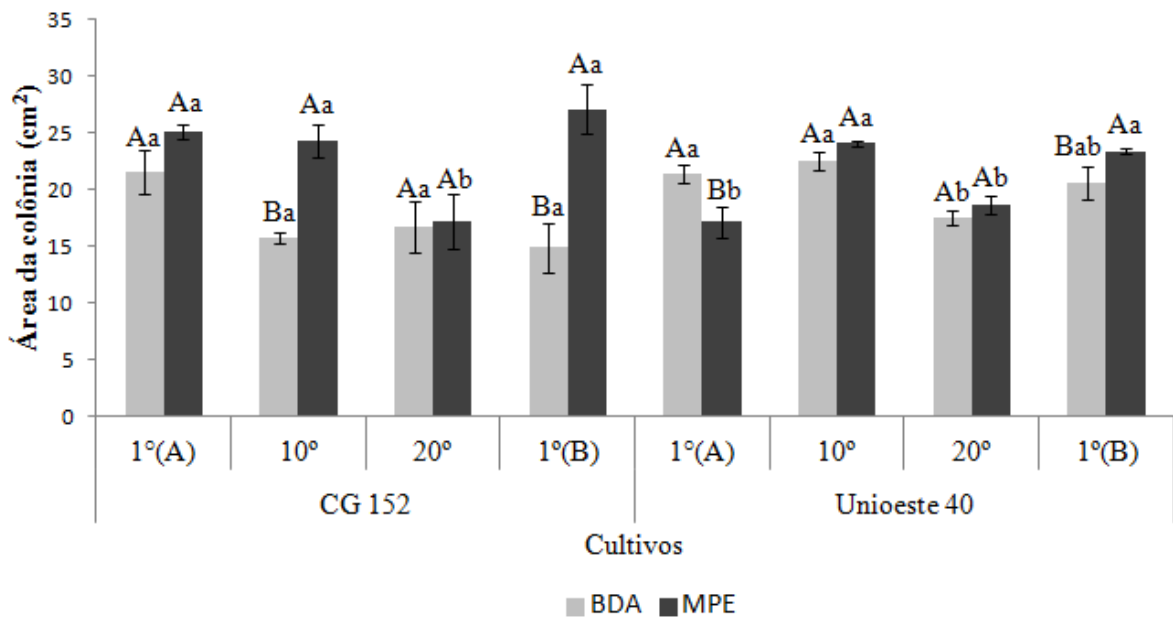
conídios × cultivos), os dados dos tratamentos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para a avaliação da virulência a *Alphitobius diaperinus* o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial  $(2 \times 4) + 1$  (meios de origem dos conídios × cultivos) + testemunha, foi submetido à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), e a comparação entre as médias do fatorial com a testemunha foi feita pelo teste Dunnett ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CRESCIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

O crescimento vegetativo e produção de conídios de *B. bassiana* foram afetados após os sucessivos cultivos em diferentes meios. Na comparação entre os sucessivos cultivos, os conídios do isolado CG152, que se desenvolveram em meio BDA não apresentaram alteração no crescimento vegetativo. Para os conídios com origem em MPE, houve redução no 20º cultivo, mas após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro, no cultivo 1º(B), a capacidade de crescimento vegetativo foi restaurada, e não diferiu dos cultivos 1º(A) e 10º. Na comparação entre os meios, o crescimento vegetativo em MPE foi superior ao BDA no 10º e 1º(B) cultivo, não diferindo nos demais (Figura 1); (Apêndice B).

**Figura 1** – Crescimento vegetativo (cm<sup>2</sup>) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey p<0,05); CG 152 (CV=19,85 %), Unioeste 40 (CV= 9,70 %); 1º(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1º(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

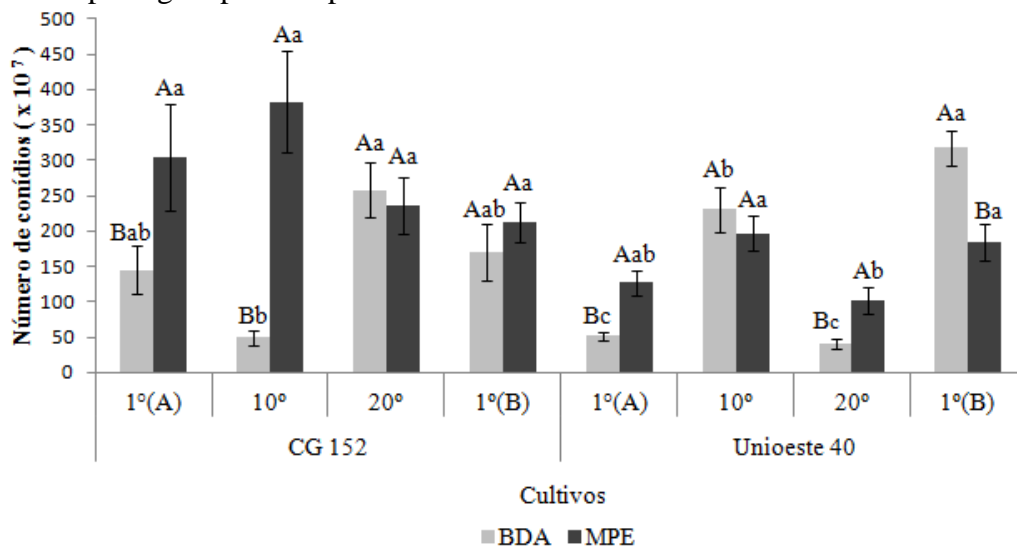


Ao compararmos os sucessivos cultivos do isolado Unioeste 40 proveniente do meio BDA, observou-se uma redução no crescimento vegetativo para os conídios do 20º cultivo, quando comparado ao 1º(A) e 10º. Após a segunda passagem do fungo pelo

hospedeiro, quando se utilizaram os conídios provenientes do cultivo 1°(B), não houve diferença no crescimento vegetativo em relação aos demais cultivos. Para os conídios (Unioeste 40) oriundos do meio MPE, também houve redução do crescimento vegetativo no 20° cultivo, entretanto, houve recuperação do crescimento no 1°(B), que não diferiu do 10°. Na comparação entre os meios, os conídios de BDA obtiveram maior crescimento vegetativo para o 1°(A) cultivo, não diferiram de MPE para o 10° e 20° e foi inferior para o 1°(B).

A produção de conídios não seguiu a mesma tendência do crescimento vegetativo. Na comparação entre os sucessivos cultivos, o isolado CG 152, em meio BDA, obteve no 20° cultivo, uma produção aproximadamente cinco vezes maior do que os conídios do 10° cultivo. Já as produções obtidas pelos conídios após as passagens pelos hospedeiros, em 1°(A) e 1°(B) foram intermediárias, não diferindo do 10° e 20° cultivos. Para os conídios provenientes de MPE, a produção não diferiu entre os sucessivos cultivos, ao contrário do que ocorreu com o crescimento vegetativo, o qual apresentou redução para os conídios do 20° cultivo. Ao se compararem os meios, os conídios provenientes de MPE obtiveram produção superior aos de BDA para o 1°(A) e 10° cultivos, com duas e sete vezes mais conídios, respectivamente. Para os conídios de 20° e 1°(B), não houve diferença entre os meios (Figura 2); (Apêndice B).

**Figura 2** – Produção de conídios ( $\times 10^7$  conídios colônia<sup>-1</sup>) *in vitro* de *Beauveria bassiana* proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), após 10 dias de incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey  $p < 0,05$ ); CG 152 (CV=47,40 %), Unioeste 40 (CV= 30,55 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Para o isolado Unioeste 40 proveniente de BDA, a produção de conídios originados no 20º cultivo foi aproximadamente cinco vezes menor do que os de 10º. Esse comportamento foi contrário ao do isolado CG 152, mostrando a diferença que pode existir entre isolados. Após a segunda passagem do Unioeste 40 pelo inseto em 1º(B), houve um aumento na produção de conídios que foi superior aos demais cultivos, produzindo até oito vezes mais conídios que os de 20º cultivo. Para os cultivos em MPE, semelhante ao que ocorreu em BDA, a produção foi reduzida quando se utilizaram conídios do 20º cultivo, e não diferiu de 1º(A). Após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro em 1º(B), também houve aumento da produção de conídios, em relação aos de 20º cultivo. Na comparação entre os meios, a produção de conídios do Unioeste 40, oriundos do meio BDA, foi inferior ao MPE para o 1º(A) e 20º cultivo, não diferiu no 10º e foi maior no 1º(B).

Os resultados obtidos mostraram que não houve correlação entre o crescimento vegetativo e a produção de conídios em alguns cultivos, como por exemplo, para o isolado Unioeste 40 proveniente do 1º(B), em que o crescimento vegetativo foi maior para os conídios de MPE e a produção foi maior para os de BDA. Para conídios do 1º(A) também não houve correlação, com maior crescimento vegetativo em BDA, e maior produção em MPE. Essas diferenças entre crescimento vegetativo e produção de conídios sugerem que a área da colônia pode expressar o crescimento vegetativo, mas nem sempre reflete o verdadeiro desenvolvimento do fungo no que se refere à quantidade de conídio produzido (MUSTAFA; KAUR, 2009; SHAH et al., 2005).

O efeito dos cultivos sucessivos *in vitro* e *in vivo*, em relação à produção de conídios, é altamente dependente de características específicas dos isolados (BUTT et al., 2006) e também do meio em que são cultivados. Safavi et al. (2007) avaliando o crescimento vegetativo e a produção de conídios em diferentes meios de cultivo verificaram que, entre os três isolados de *B. bassiana* testados, cada um apresentou uma resposta diferente ao meio, para as duas variáveis avaliadas. Assim, o suprimento de nutrientes nos meios de cultivo e as condições em que são cultivados afetam as características de crescimento da grande maioria dos fungos entomopatogênicos (HUMBER, 2008). Esse fato também foi verificado nesse estudo, onde ambos isolados avaliados apresentaram diferenças no crescimento vegetativo e produção de conídios influenciadas pelos meios onde foram cultivados e também pelos sucessivos cultivos.

O estudo dos efeitos de cultivos sucessivos *in vitro* e dos diferentes meios, tanto para o crescimento vegetativo, como para a produção de conídios, é de fundamental importância, pois o bom desempenho dos fungos entomopatogênicos no controle biológico é

dependente da sua capacidade em produzir altas concentrações de propágulos infectivos *in vitro*, visto que, para um controle efetivo de pragas, é necessário que haja um elevado potencial de inóculo na área, o que se consegue por meio de aplicações inundativas no campo (ALVES; PEREIRA, 1998).

Atenuações em algumas características como crescimento, esporulação e virulência podem ocorrer após sucessivos cultivos de alguns isolados (KHACHATOURIANS, 1991; HAYDEN et al., 1992), o que pode ser decorrência de mudanças genéticas por meio de um ciclo parassexual em *B. bassiana* 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 (FENG et al., 1994). Foi verificado por Kawakami (1960), que alterações morfológicas das colônias e taxa de crescimento de um fungo entomopatogênico, foram revertidas após uma única passagem pelo hospedeiro. Esse fato também ocorreu no presente trabalho para os dois isolados avaliados, onde os conídios produzidos em MPE sofreram redução na área das colônias após os sucessivos cultivos, e com a passagem do fungo pelo hospedeiro, a capacidade de crescimento vegetativo foi restaurada. A produção do isolado Unioeste 40, tanto em BDA, como em MPE, que decaiu após os sucessivos cultivos, também obteve um incremento após a passagem pelo hospedeiro.

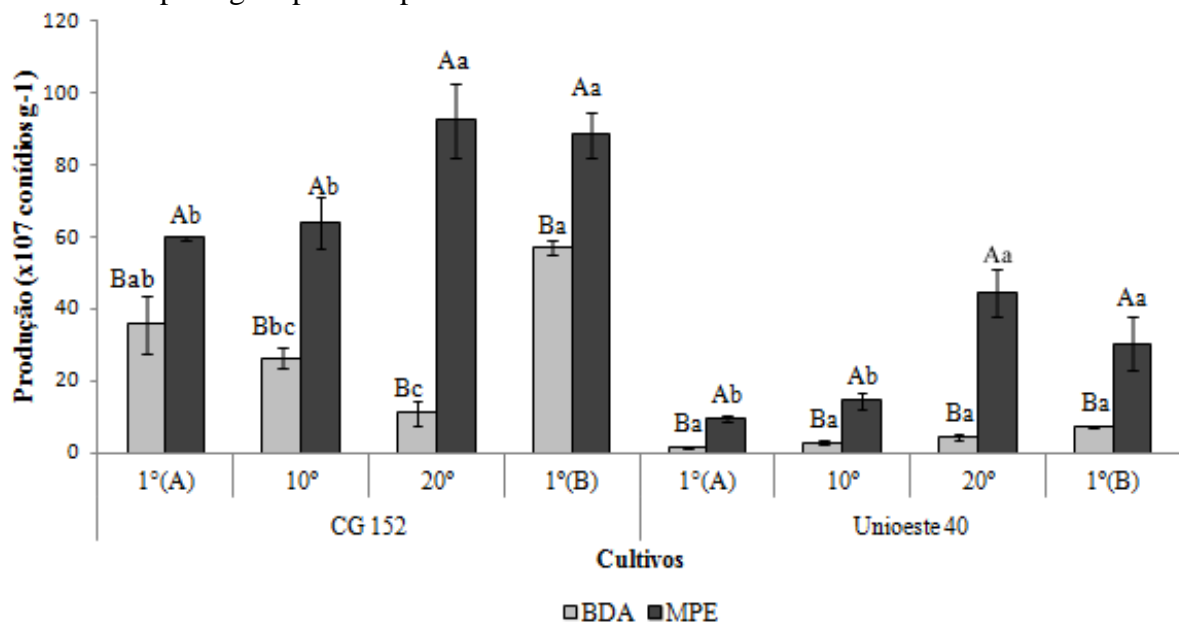
Além disso, é importante saber que a passagem do fungo pelo hospedeiro restabeleceu a capacidade de crescimento vegetativo e de produção para os conídios após os sucessivos cultivos, independente do meio em que ocorreram, pois em produções em larga escala, caso os conídios que dão origem as matrizes não sejam produzidos em meios que preservem as características produtivas, é fundamental realizar a passagem periódica do fungo pelo hospedeiro.

Os estudos sobre crescimento e esporulação de fungos entomopatogênicos resultam em dados bastante diversificados, o que pode ser devido à variabilidade existente entre os isolados, ou até, aos diferentes métodos de avaliação utilizados. Estabelecer condições de cultivo que promovam a alta produção de propágulos infectivos são essenciais para a qualidade da produção em larga escala e para a competitividade dos produtos comerciais (BARBOSA et al. 2002).

## 5.2 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os sucessivos cultivos dos isolados de *B. bassiana* em diferentes meios afetaram a produção de conídios em arroz. Para o isolado CG 152 proveniente do meio BDA, as maiores produções em arroz foram em 1°(A) e 1°(B), que não diferiram entre si. Já as produções no 10° e 20° cultivo foram menores, principalmente em relação ao 1°(B), que chegou a produzir aproximadamente cinco vezes mais conídios comparados ao 20°. Para os conídios provenientes de MPE, os menores valores foram obtidos para os de 1°(A) e 10° cultivos, havendo um incremento para os de 20° e 1°(B), não diferindo entre si. Na comparação entre os meios, a produção em arroz foi superior quando se utilizaram conídios (CG 152) provenientes de MPE, sendo a diferença entre eles, mais pronunciada para os conídios do 20° cultivo, onde a produção em MPE foi de  $92,51 \times 10^7$  conídios  $g^{-1}$ , e em BDA foi de  $11,33 \times 10^7$  conídios  $g^{-1}$ , confirmando a influência das condições nutricionais de cultivo sobre a capacidade produtiva do fungo (Figura 3); (Apêndice C).

**Figura 3.** – Produção de conídios de *Beauveria bassiana* em arroz, inoculado com conídios provenientes de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), 15 dias após incubação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey  $p < 0,05$ ); CG 152 (CV=22,07 %), Unioeste 40 (CV= 50,34 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Para o isolado Unioeste 40, os conídios originados dos cultivos em BDA proporcionaram uma baixa produção em arroz, não havendo diferenças entre os sucessivos cultivos. Já para os conídios oriundos do meio MPE, o isolado Unioeste 40 seguiu a mesma tendência do CG 152, com maior produção para os conídios de 20° e 1°(B) cultivos, que não diferiram entre si. Na comparação entre os meios, a produção foi maior para os conídios (Unioeste 40) provenientes do MPE em todos os cultivos, sendo que a maior diferença foi também para os de 20° cultivo, que produziu  $44,50 \times 10^7$  conídios  $g^{-1}$  em MPE e  $4,58 \times 10^7$  conídios  $g^{-1}$  em BDA. O aumento da produção para os conídios do 20° cultivo em MPE provavelmente está relacionado com o fato de ser o meio MPE mais rico ou elaborado propiciando ao fungo ali desenvolvido, melhores condições nutricionais que se refletiram quando inoculado no arroz.

Também em outros trabalhos, observou-se que os fungos entomopatogênicos podem apresentar redução no crescimento vegetativo e produção de conídios após os cultivos sucessivos *in vitro*. Alguns isolados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) reduziram a produção de micélio em meio líquido e de conídios em meio sólido após 30 cultivos em meio SDA (Sabouraud, Dextrose, Ágar) (VANDENBERG; CATONE, 2004). Entretanto, esse comportamento pode variar entre os isolados e com o meio de cultivo onde o inóculo foi produzido (QUESADA-MORAGA; VEY, 2003). Houve alteração na produção de conídios em arroz após os sucessivos cultivos, entretanto, os dois isolados avaliados, tanto em meio BDA como em MPE obtiveram um incremento e/ou manutenção da produção no cultivo 1°(B), que ocorreu após uma única passagem do fungo pelo inseto, demonstrando que a capacidade produtiva do fungo pode ser restaurada após sua passagem pelo hospedeiro. Esses resultados confirmam a necessidade de se fazer periodicamente o controle de qualidade dos propágulos produzidos em larga escala, o que possibilitará identificar a necessidade de se realizar a passagem do fungo pelo hospedeiro (ALVES et al., 2008c)

A composição do meio, bem como a quantidade de nutrientes disponíveis, pode influenciar o desenvolvimento do fungo, a produção de conídios e a virulência desses micro-organismos (KAMP; BIDOCHKA, 2002). Nesse estudo, foi possível verificar, para os isolados avaliados, que o meio de cultivo onde se iniciam os cultivos também afeta a produção de conídios em arroz, pois os sucessivos cultivos em MPE originaram conídios mais produtivos do que os de BDA, obtendo as maiores produções em arroz. Essa informação é de grande relevância, possibilitando a um produto comercial a base de arroz, tornar-se mais competitivo e econômico para o produtor.

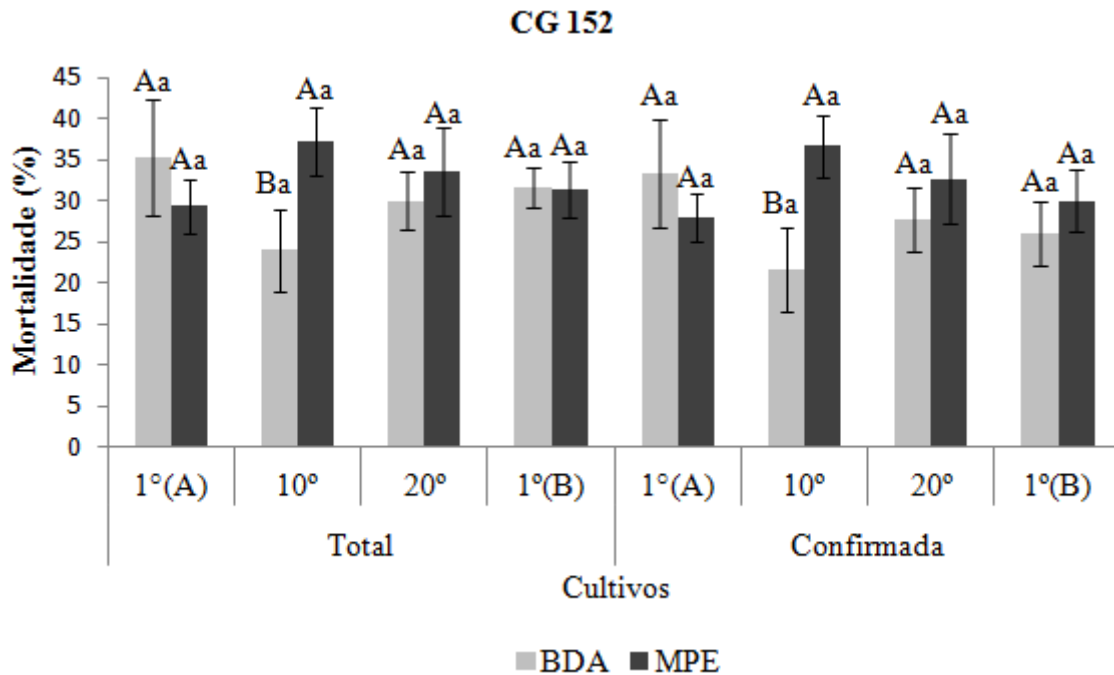
Os substratos sólidos, especialmente grãos de arroz, são os mais utilizados para a produção de fungos entomopatogênicos em larga escala, principalmente devido ao baixo custo (ALVES; PEREIRA 1998). É comum que os processos de produção se iniciem com a multiplicação dos conídios em meio BDA, os quais são posteriormente utilizados para a produção em matrizes sólidas ou líquidas (LEITE et al., 2003). Esse fato torna relevante a pesquisa e utilização de um meio de cultivo que eleve e/ou preserve as características produtivas, como ocorreu nesse estudo com o meio MPE, ou então, realizar a passagem periódica do fungo pelo hospedeiro, já que a estabilidade da capacidade produtiva é uma característica desejável para o desenvolvimento de produtos comerciais à base de fungos (VANDENBERG; CATONE 2004).

A possibilidade de cultivo *in vitro* é uma das principais vantagens de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* (LEITE et al., 2003), e a capacidade de aumento e/ou manutenção da produtividade é uma característica importante na produção em larga escala. Por esse motivo, é importante conhecer os efeitos das condições nutricionais e dos sucessivos cultivos do fungo em relação à produção de conídios em arroz.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA A *ALPHITOBIOUS DIAPERINUS*

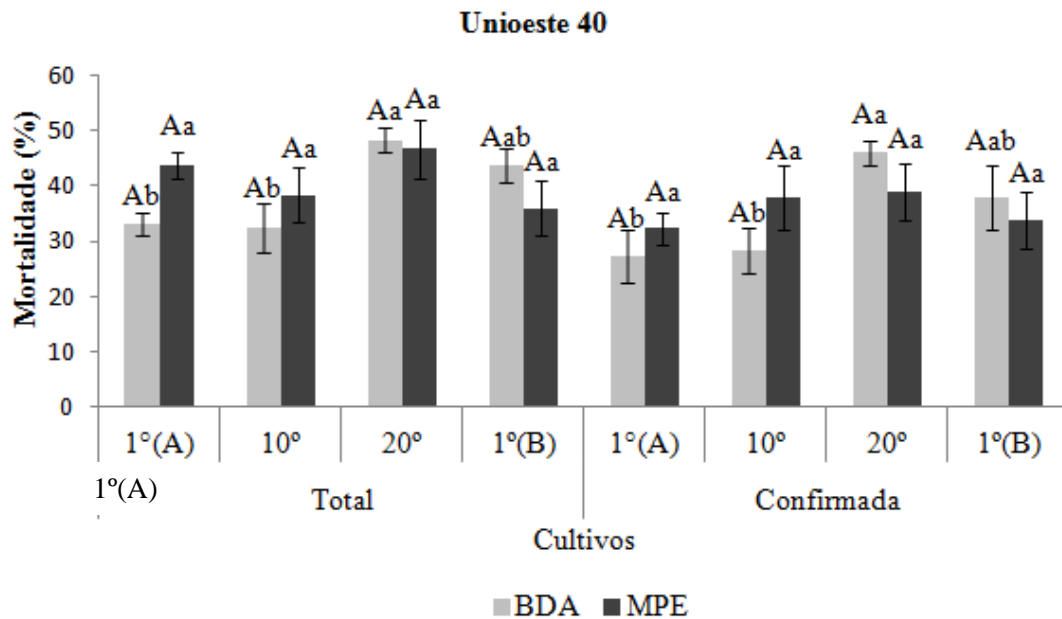
Os sucessivos cultivos *in vitro* e as condições nutricionais do meio de cultivo afetaram a virulência de *B. bassiana* a *A. diaperinus*. Para o isolado CG 152 os sucessivos cultivos nos meios BDA e MPE não reduziram as mortalidades total e confirmada, e a passagem do fungo pelo hospedeiro não favoreceu o incremento da virulência (Figura 4); (Apêndice D).

**Figura 4** – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por *Beauveria bassiana* (CG 152) proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos) ao décimo dia após a aplicação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); para mortalidade total (CV=35,04 %) e confirmada (CV=38,04 %). As mortalidades nas testemunhas, total (4,00 %) e confirmada (0 %), diferem dos demais tratamentos (Dunnett,  $p < 0,05$ ); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Para o isolado Unioeste 40, proveniente do meio BDA houve manutenção nos níveis de mortalidade total e confirmada até o 10° cultivo, e um incremento no 20°. Após a segunda passagem dos conídios pelo hospedeiro, em 1°(B), não houve diferença em relação aos demais cultivos. Para os conídios oriundos de MPE, a estabilidade na virulência foi mantida ao longo dos cultivos (Figura 5); (Apêndice D). Na comparação entre os meios, os conídios do isolado CG 152, originados em MPE no 10° cultivo, obtiveram as maiores taxas de mortalidade total e confirmada. Nos demais cultivos, para os dois isolados, não houve diferença entre BDA e MPE. As mortalidades, total e confirmada, nos tratamentos com os conídios provenientes dos sucessivos cultivos foram superiores às testemunhas.

**Figura 5** – Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por *Beauveria bassiana* (Unioeste 40) proveniente de cultivos sucessivos em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos) ao décimo dia após a aplicação; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); para mortalidade total (CV=24,59 %) e confirmada (CV=32,19 %). As mortalidades nas testemunhas, total (4,00 %) e confirmada (0 %), diferem dos demais tratamentos (Dunnnett,  $p < 0,05$ ); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro



A estabilidade de virulência após sucessivas passagens *in vitro* é uma característica desejável para fungos entomopatogênicos produzidos em larga escala (VANDENBERG; CANTONE, 2004). Entretanto, os efeitos desses sucessivos cultivos na virulência variam com as espécies e os isolados (QUESADA-MORAGA; VEY, 2003).

Alguns trabalhos indicam a manutenção da virulência após sucessivas repicagens de hyphomycetes *in vitro* (HALL, 1980; HAYDEN et al., 1992), porém outros relatam sua redução (FARGUES; ROBERT, 1983; SHAH et al., 2007). Aizawa (1979) e Morrow et al. (1989) verificaram redução da virulência de *N. rileyi* e *B. bassiana* após 10 e 16 passagens por meio de cultura, respectivamente. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas entre as taxas de mortalidade de *Bemisia argentifoli* infectadas com fungos após 15 passagens em meio SDA (Sabouraud, Dextrose, Ágar) (BROWNBRIDGE, 2001). Após 30 transferências sucessivas *in vitro* não foi observada alteração na virulência de *Paecilomyces fumosoroseus* (VANDENBERG; CATONE 2004). Da mesma forma, após 15 subcultivos *in vitro*, não ocorreu a perda de virulência para *Paecilomyces farinosus* (HAYDEN et al., 1992).

Apesar dos resultados obtidos no presente trabalho mostrarem alterações nos demais parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana* provocadas pelos sucessivos cultivos *in vitro*, a estabilidade na virulência foi mantida para o isolado CG 152 proveniente dos dois meios avaliados. Essas diferenças também foram observadas por Hall (1980), onde mesmo após 98 passagens *in vitro* de *Verticillium lecanii*, a virulência a *Macrosiphoniella sanborni* não foi afetada, mas ocorreram alterações morfológicas e redução na taxa de crescimento das colônias.

A passagem dos isolados CG 152 e Unioeste 40 pelo hospedeiro *Alphitobius diaperinus* não favoreceu o incremento nos níveis de mortalidade. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, como Latch (1976) e Morrow et al. (1989), que também não observaram aumento da virulência de *B. bassiana* após passagem pelo hospedeiro. Entretanto, resultados contrastantes foram obtidos em alguns trabalhos que verificaram incremento na virulência de entomopatógenos após algumas passagens por insetos hospedeiros (KAWAKAMI, 1960, FARGUES; ROBERT, 1983).

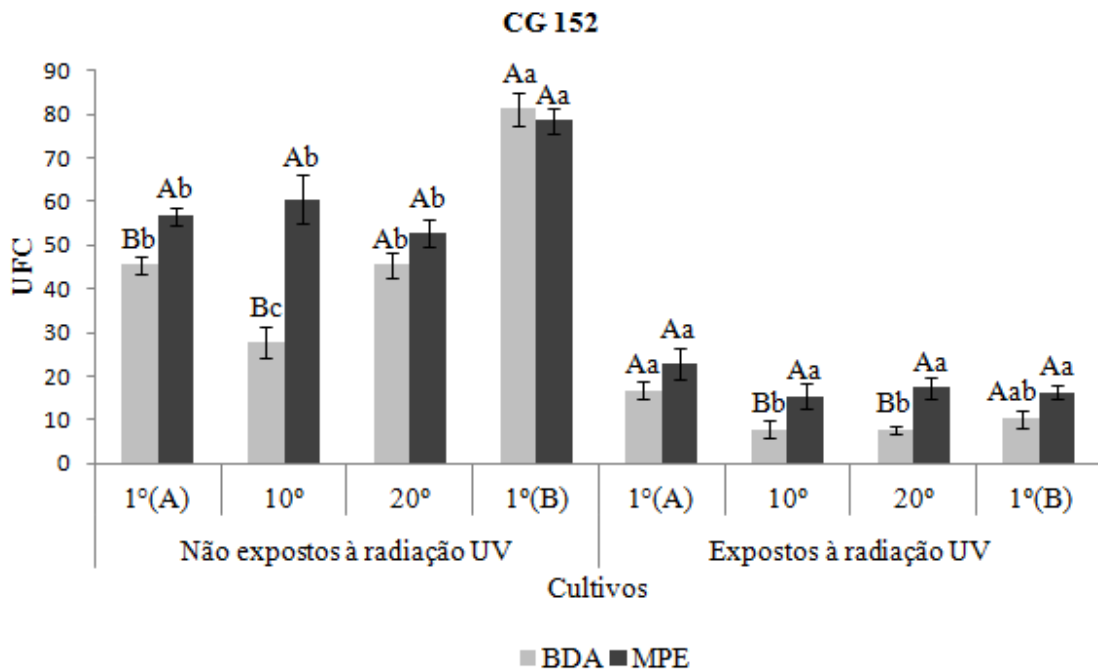
A virulência de conídios é fortemente dependente das condições nutricionais durante o cultivo (SHAH et al., 2005). O tipo de meio de cultivo também pode afetar os sucessivos cultivos *in vitro*, como foi verificado por Quesada-Moraga e Vey (2003), onde duas passagens pelo meio SDA causaram um declínio na virulência de conídios, enquanto duas passagens através MA (Malte, Ágar) resultaram em conídios mais virulentos. No presente estudo, não houve diferença na porcentagem de mortalidade obtida com os conídios produzidos tanto em meio BDA como em MPE, entretanto, o isolado Unioeste 40, originado em BDA foi o único que sofreu alteração na virulência após os sucessivos cultivos, o que confirma que esse parâmetro pode variar com os meios e isolados analisados.

Essas aparentes contradições sobre a virulência de fungos entomopatogênicos após sucessivas repicagens em diferentes meios de cultura servem para realçar a considerável variação inter e intraespecífica para a estabilidade genética desta característica. Outro fator que pode ser responsável por esta variabilidade nos resultados obtidos em diferentes estudos são as diferentes metodologias empregadas, por exemplo, utilização de conídios de origem monospórica ou multispórica, uso de meios de cultura mais nutritivos, mutações e condições de cultivo (BROWNBRIDGE et al., 2001).

#### 5.4 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV

A interação entre os sucessivos cultivos e os diferentes meios foi significativa, e a viabilidade dos conídios foi reduzida após a exposição à radiação UV por um minuto. Para conídios do isolado CG 152, provenientes de BDA, e que não foram expostos à radiação UV, houve redução no número de UFC no 10º cultivo. Após a segunda passagem pelo hospedeiro, em 1º(B), houve um incremento nas UFC, superior aos demais cultivos. Para os conídios do isolado CG152, oriundos de MPE, não houve diferença na quantidade de UFC do 1º(A) ao 20º cultivo, e apenas em 1º(B) houve um acréscimo em relação aos demais. Na comparação entre os meios, os conídios não expostos, originados em MPE no 1º(A) e 10º cultivo obtiveram maior número de UFC que os de BDA, e no 20º e 1º(B) não houve diferença (Figura 6); (Apêndice E).

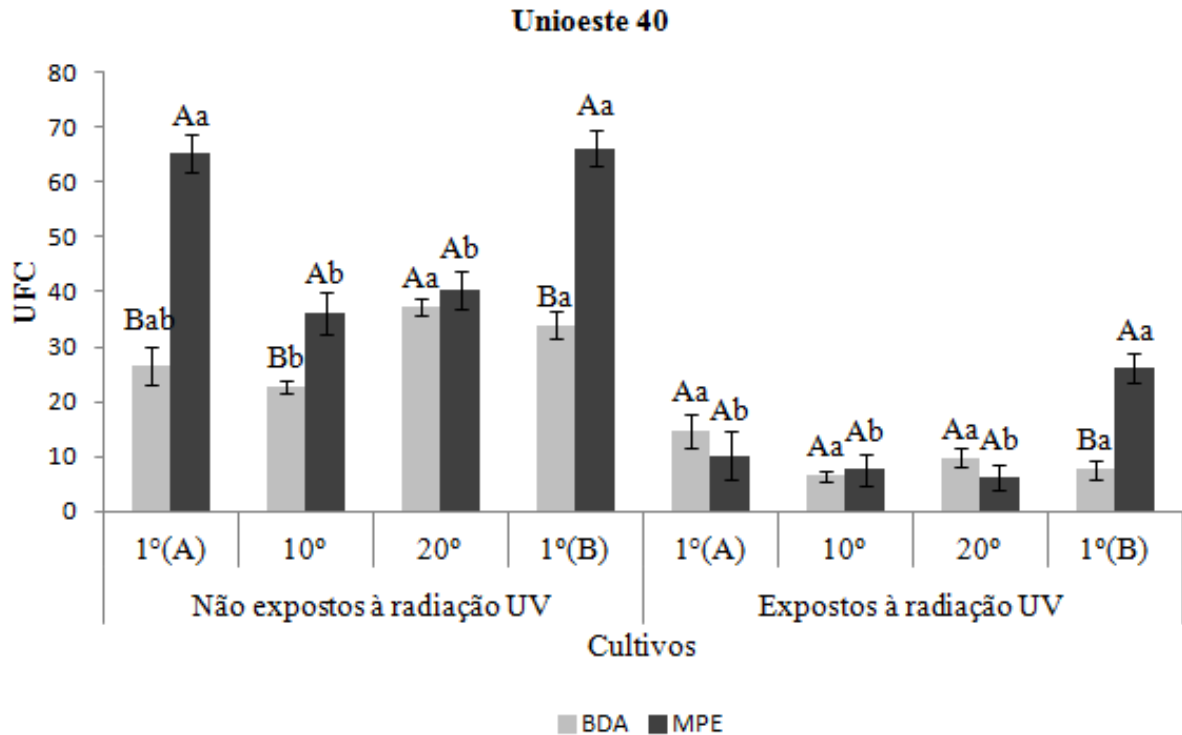
**Figura 6** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (CG 152) a partir de conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos à radiação ultravioleta por um minuto; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos à radiação ultravioleta (CV= 15,07 %); Expostos à radiação ultravioleta (CV= 39,69 %); 1º(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1º(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Para os conídios (CG 152) que foram expostos à radiação UV, originados em meio BDA, a tolerância a UV foi afetada pelos sucessivos cultivos, sendo que os mais tolerantes foram obtidos em 1°(A). Já os mais sensíveis foram os de 10° e 20°, que não diferiram entre si. O cultivo 1°(B) produziu conídios de sensibilidade intermediária, não diferindo dos demais. Para os conídios oriundos de MPE, houve manutenção do número de UFC ao longo dos sucessivos cultivos. Na comparação entre os meios, o desenvolvimento em MPE foi mais favorável no 10° e 20°, produzindo o dobro de UFC do que em BDA, e não diferiu nos demais.

Houve variabilidade entre os isolados de *B. bassiana* em relação à tolerância à radiação UV após os sucessivos cultivos. Para o isolado Unioeste 40, proveniente do meio BDA e não expostos a radiação UV, os sucessivos cultivos afetaram a formação de UFC. O menor número foi observado no 1°(A) e 10° cultivo, que não diferiram. Houve um aumento no número de UFC no 20° e 1°(B) cultivos, quando comparados ao 10°, porém não diferiram de 1°(A). Os conídios do Unioeste 40 originados em MPE foram afetados negativamente no 10° e 20° cultivos, porém, após a passagem pelo inseto, em 1°(B), o número de UFC aumentou, e não diferiu de 1°(A). Na comparação entre os meios, observou-se maior formação de UFC a partir dos conídios produzidos em MPE em todos os cultivos, exceto no 20°, em que não diferiu dos produzidos em BDA (Figura 7); (Apêndice E).

**Figura 7** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (Unioeste 40) a partir de conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos à radiação ultravioleta por um minuto; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos à radiação ultravioleta (CV= 17,49 %); Expostos à radiação ultravioleta (CV= 58,34 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Após a exposição do isolado Unioeste 40 à radiação UV, os conídios provenientes de BDA não sofreram alteração na viabilidade na comparação entre os sucessivos cultivos. Para os de MPE, houve manutenção na quantidade de UFC do 1°(A) ao 20° cultivo, porém, após a passagem pelo hospedeiro em 1°(B), foi observado um aumento de aproximadamente quatro vezes em relação ao 20°. Na comparação entre os meios, não houve diferença entre os cultivos, exceto em 1°(B), onde MPE proporcionou maior tolerância dos conídios à radiação UV.

Para os dois isolados avaliados, a qualidade dos conídios provenientes tanto de MPE quanto de BDA foi afetada pela radiação UV, o que foi observado pela redução da quantidade de UFC em relação aos não expostos. Considerando o número médio de UFC em todos os cultivos, o isolado CG 152 oriundo de BDA e MPE exposto à radiação UV, obteve respectivamente 78 % e 71 % de redução na viabilidade. O mesmo ocorreu para o isolado Unioeste 40, onde a redução da viabilidade foi de aproximadamente 68 % em BDA e 75 %

em MPE (Figuras 6 e 7). Estes resultados confirmam a sensibilidade do fungo à radiação, o que pode comprometer sua eficiência no campo, através de danos causados às macromoléculas celulares, como os ribossomos, as proteínas, as biomembranas, o RNA e o DNA (ENGELBERG et al., 1994;. GRIFFITHS et al., 1998), sendo que um dos fatores da inativação dos conídios é a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano no DNA (CHELICO et al., 2005), que é capaz de reduzir a eficiência de fungos em programas de controle biológico.

A tolerância à radiação UV é considerada uma característica fenotípica de natureza quantitativa, e envolve artifícios de defesa que impedem ou reduzem os danos aos componentes intracelulares. Ela também está relacionada a vários sistemas que repararam os danos causados pela radiação durante a recuperação celular (CHELICO et al., 2006). Essa característica pode ser influenciada pelo ambiente, e assim, alterações em métodos de cultivo e componentes nutricionais do meio podem ser utilizadas como estratégias para aumentar a tolerância do fungo à radiação UV (RANGEL et al., 2004). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que um dos fatores que interfere na tolerância do fungo a radiação UV é a condição nutricional oferecida durante seu cultivo.

Entre as possíveis ferramentas que se pode utilizar durante as fases de crescimento e esporulação para elevar a tolerância dos conídios à radiação UV, está a exposição a estresse ambiental ou nutricional, que aparentemente, pode levar a produção de conídios com maior resistência à radiação UV em um fenômeno conhecido como proteção cruzada (RANGEL et al., 2008). Assim, a manipulação das condições físicas e/ou químicas do meio de cultivo é uma possibilidade para aumentar a tolerância à radiação UV (RANGEL et al., 2004), bem como a adição de alguns nutrientes a meios usualmente empregados na produção massal de fungos, que também podem aumentar essa tolerância.

Alguns estudos mostram que conídios produzidos em meios não adequados ao desenvolvimento dos fungos podem apresentar maior resistência à radiação UV. Este fato foi verificado por Rangel et al. (2006) que cultivaram o fungo em meio de batata, dextrose, ágar com extrato de levedura (PDAY), em Meio Mínimo (MM, meio Czapek sem sacarose) ou em meio mínimo com dezesseis diferentes fontes de carbono. Os autores observaram que conídios produzidos sob estresse nutritivo (MM ou MM suplementados com diferentes fontes de carbono não-preferenciais, por exemplo, frutose, galactose, lactose) apresentavam uma tolerância pelo menos duas vezes maior do que os conídios produzidos em meio rico (PDAY). Respostas semelhantes foram obtidas neste estudo, onde o isolado Unioeste 40 cultivado em meio BDA, com menor disponibilidade de nutrientes, mostrou maior tolerância a radiação UV

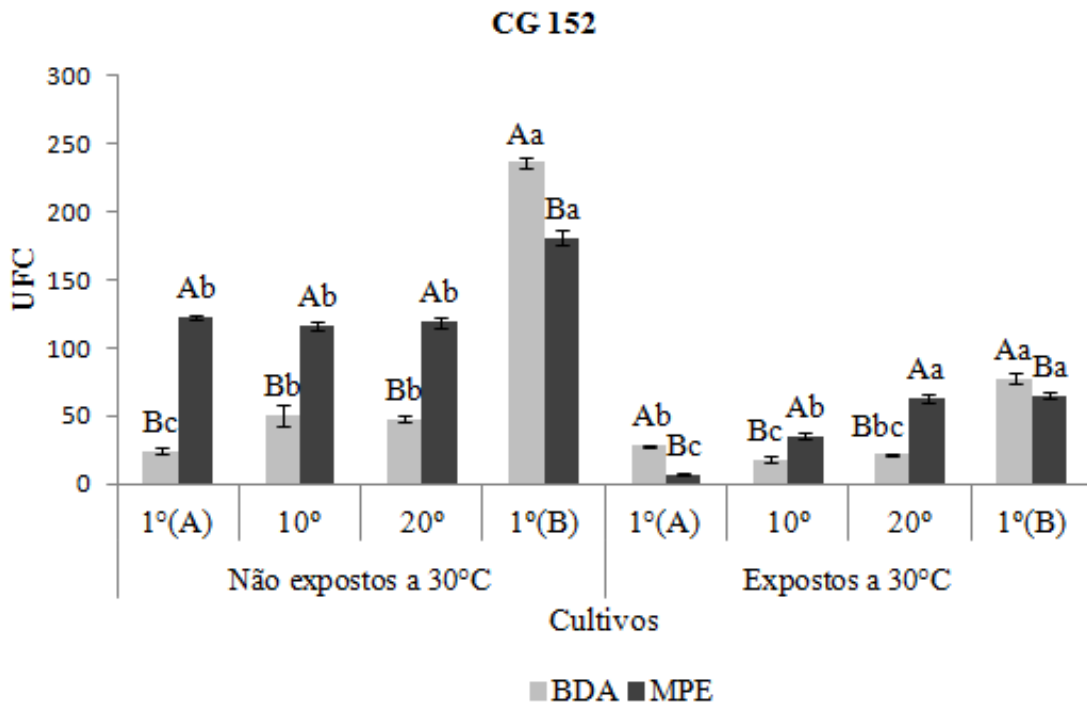
do que em MPE, e também não sofreu alteração no número de UFC após os sucessivos cultivos. Entretanto, esse fato não ocorre para todos os isolados, já que para o isolado CG 152, a maior tolerância foi observada para os conídios oriundos de MPE, com maior disponibilidade de nutrientes. Assim, os isolados possuem comportamento diferencial entre si dependendo do meio de cultivo. Santoro (2011) constatou que as necessidades nutricionais de *B. bassiana* variam para os diferentes isolados, o que pode estar associado à variabilidade genética entre eles.

Para incrementar a tolerância à radiação UV, além da manipulação nutricional do meio de cultivo, é necessário selecionar isolados mais resistentes. Alguns trabalhos mostram uma grande variabilidade na tolerância à radiação solar entre *B. bassiana* e *M. anisopliae* e até mesmo entre isolados da mesma espécie (FARGUES et al., 1996; FERNANDES et al., 2007). Desta forma, estudos têm procurado selecionar isolados mais resistentes bem como a adição de fotoprotetores nas formulações (INGLIS et al., 1995; EDGINGTON et al., 2000; REDDY et al., 2008). Os resultados obtidos no presente trabalho também mostraram variabilidade entre os isolados de *B. bassiana* em relação à tolerância à radiação UV. Os sucessivos cultivos em diferentes meios afetaram a sensibilidade dos conídios à radiação, e a passagem do fungo pelo hospedeiro foi benéfica, podendo ser considerada mais uma estratégia para aumentar a tolerância do fungo à radiação UV.

## 5.5 TOLERÂNCIA À TEMPERATURA ELEVADA

A exposição dos conídios a temperatura de 30 °C, por 15 dias, foi suficiente para reduzir a sua viabilidade. A interação entre os sucessivos cultivos e os meios de cultivo foi significativa, afetando a qualidade dos conídios dos isolados CG 152 e Unioeste 40 após a exposição à temperatura elevada. Para CG 152, proveniente do meio BDA, e que não foi exposto à temperatura de 30 °C, o número de UFC (24) foi baixo no cultivo 1°(A), com um aumento de aproximadamente duas vezes no 10° e 20°, que não diferiram entre si, e de 10 vezes no cultivo 1°(B), que obteve 236 UFC. Para os conídios provenientes de MPE, houve manutenção na quantidade de UFC até o 20° cultivo, e após segunda passagem do fungo pelo hospedeiro, em 1°(B), a quantidade de UFC aumentou aproximadamente 57 %. Na comparação entre os meios, o número de UFC foi maior para os conídios oriundos de MPE, exceto em 1°(B) (Figura 8); (Apêndice F).

**Figura 8** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (CG 152) com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos a 30 °C por 15 dias; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Não expostos a 30 °C (CV=8,53 %); Expostos a 30 °C (CV=13,38 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

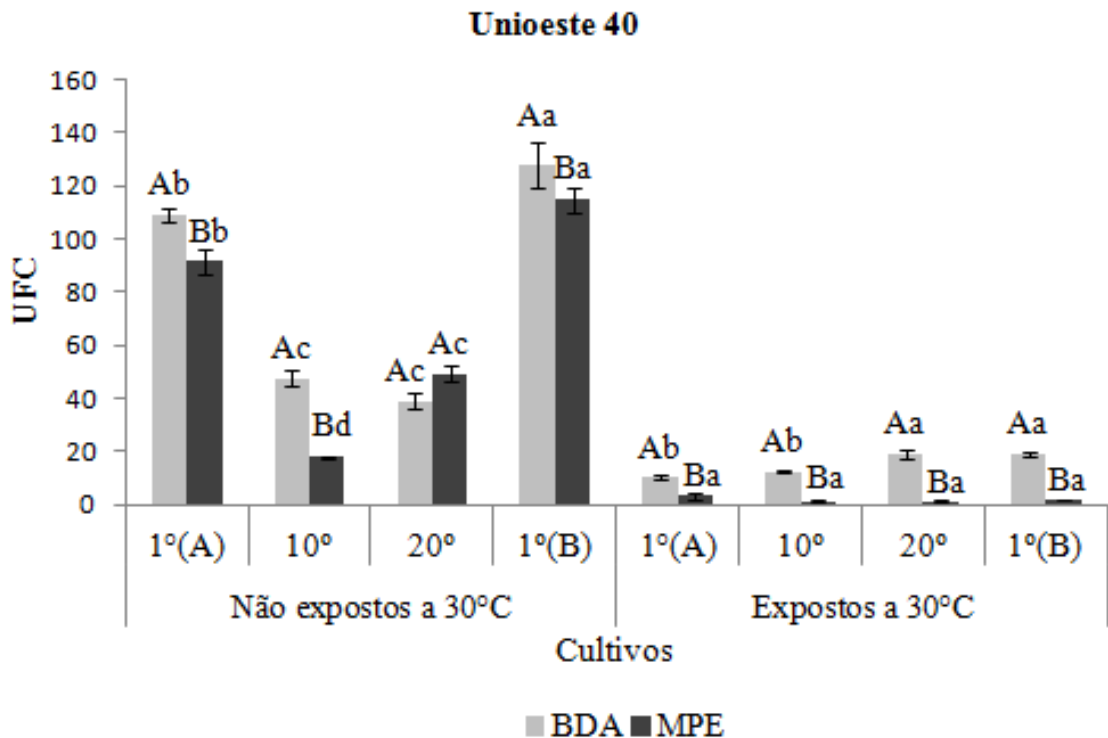


Após a exposição a 30 °C, a maior tolerância à temperatura foi observada para os conídios originados do fungo (CG 152) que se desenvolveu em BDA no cultivo 1°(B), com 76 UFC. Já os mais suscetíveis foram os de 10° e 20°, com 18 e 21 UFC respectivamente, e que não diferiram entre si. Para os conídios obtidos do fungo que se desenvolveu em meio MPE, houve um aumento crescente da tolerância a temperatura, que foi maior no 20° e 1°(B), com 63 e 65 UFC, não diferindo entre si. Assim, na comparação entre os meios, BDA proporcionou maior tolerância em 1°(A) e 1°(B), já nos cultivos 10° e 20°, MPE mostrou-se superior.

Foi possível observar uma variabilidade entre o comportamento dos isolados de *B. bassiana* em relação ao crescimento sob diferentes temperaturas. Para o isolado Unioeste 40, oriundo do meio BDA, e não exposto a temperatura elevada, os sucessivos cultivos afetaram o número de UFC. Comparados ao 1°(A) cultivo, houve redução de UFC em até 65 % para os conídios de 10° e 20° cultivo, os quais não diferiram entre si. Após uma

nova passagem do fungo pelo hospedeiro, em 1°(B), houve um incremento do número de UFC, que foi aproximadamente três vezes maior em relação ao número obtido no 20° cultivo. Para os conídios oriundos de MPE, as menores quantidades de UFC também foram observadas para conídios de 10° e 20° cultivos, com 18 e 49 UFC, quando comparadas aos de 1°(A) e 1°(B), com 91 e 115 UFC respectivamente. Na comparação entre os meios, os conídios provenientes de BDA apresentaram maior quantidade de UFC, exceto no 20° cultivo em que não diferiu de MPE (Figura 9); (Apêndice F).

**Figura 9** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (Unioeste 40) com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos a 30 °C por 15 dias; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Não expostos a 30 °C (CV=13,23 %); Expostos a 30 °C (CV=26,52 %) 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



A exposição dos conídios do isolado Unioeste 40 a temperatura de 30 °C afetou drasticamente sua qualidade, com redução no número de UFC superior a 90 % para os de BDA e de 98 % para os de MPE. Na comparação entre os sucessivos cultivos, os conídios provenientes de BDA no 20° e 1°(B), foram menos afetados pela temperatura quando

comparados aos de 1°(A) e 10°. Para os conídios de MPE não houve diferença entre os cultivos. Na comparação entre os meios, BDA foi superior em todos os cultivos.

As condições nutricionais dos meios de origem dos conídios nas diferentes repicagens e as diferenças genéticas entre os isolados podem ser responsáveis pelas variabilidades dos resultados. O meio MPE, nutricionalmente mais rico, pode ter favorecido, ao longo das repicagens, uma melhor reserva de nutrientes nos conídios, proporcionando ao isolado CG 152 uma maior tolerância à temperatura, quando comparado aos originados em BDA no 10° e 20° cultivos.

Levando em consideração o número médio de UFC dos conídios não expostos e expostos a 30 °C, o cultivo em meio BDA proporcionou maior termotolerância aos dois isolados avaliados. Essa característica pode estar relacionada a uma menor variabilidade e disponibilidade de nutrientes no meio BDA, pois segundo Rangel (2008), o estresse nutricional pode estar relacionado com uma maior termotolerância. Os conídios cultivados sob condições limitadas de nutrientes podem concentrar maior quantidade de trealose (LENG et al., 2011), que é um carboidrato, e seu acúmulo nos conídios confere maior termotolerância aos fungos (HALLSWORTH; MARGAN, 1995; SINGER; LINDQUIST, 1998). Além disso, a adição de carboidrato no meio de cultivo também favorece o acúmulo de trealose nas células fúngicas (KIM et al., 2010), o que pode explicar a maior tolerância proporcionada pelo meio BDA, composto por dextrose e batata, fonte de carboidratos e amido, que somados correspondem a 30 % de sua composição. Outro fator relacionado à maior termotolerância dos conídios produzidos em meio BDA está relacionado com o alto teor de carbono presente nos conídios, provavelmente devido à presença de amido e outros carboidratos proveniente da batata, além da adição de dextrose (SANTORO, 2011).

Os resultados obtidos para os conídios produzidos nos dois meios de cultivo sugerem que a manipulação das condições nutricionais do meio pode incrementar a termotolerância, assim como a passagem do fungo pelo hospedeiro, que também pode favorecer a manutenção e/ou aumento dessa característica. Esse fato leva a possibilidade de aprimorar a qualidade da produção de fungos em larga escala, resultando em patógenos mais tolerantes, pois uma das principais razões da redução na vida útil dos fungos é a instabilidade a altas temperaturas (DEVI et al., 2005; FERNANDES et al., 2007; KIM et al., 2008).

Entre os danos causados pela alta temperatura, o principal deles é a desnaturação de proteínas (SETLOW; SETLOW, 1998). Assim, conídios mais tolerantes a temperaturas elevadas são essenciais para manter a viabilidade e também são importantes durante o processo infeccioso, pois alguns insetos, em especial quando doentes, podem elevar

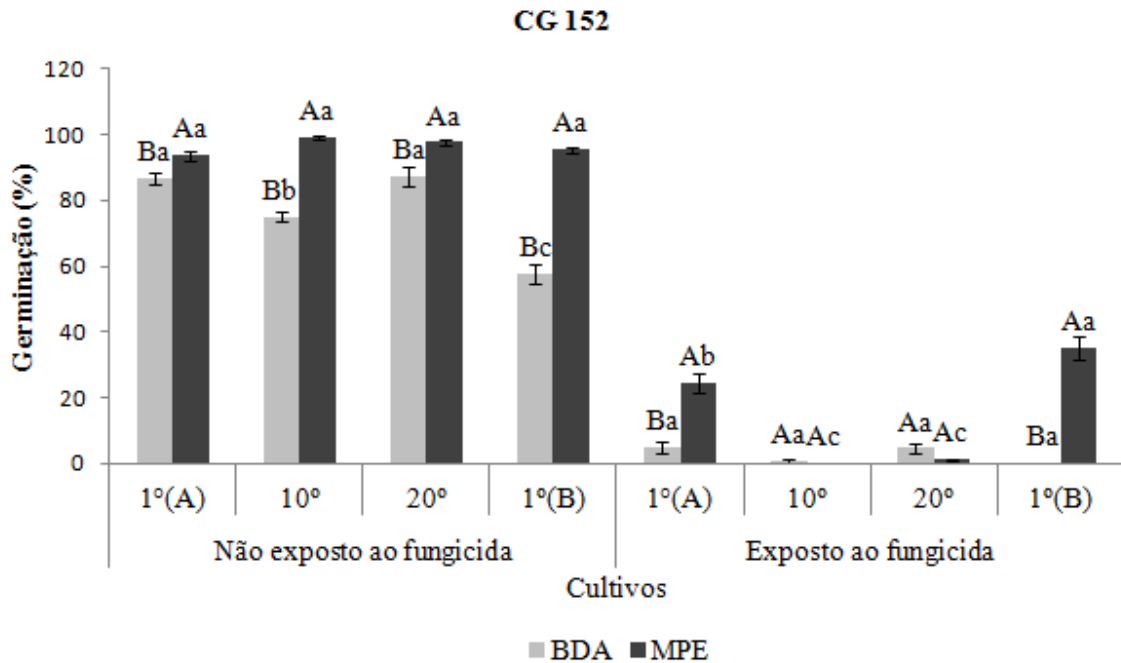
a temperatura do corpo acima da temperatura ambiente, quer como parte de sua resposta imune inata ou se aquecendo ao sol, um fenômeno conhecido como "febre comportamental" (HEINRICH, 1995; ROY et al., 2006). O aumento da temperatura corporal é uma maneira eficaz de afastar as infecções fúngicas (CRECY 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).

A temperatura é um dos principais fatores limitantes para fungos entomopatogênicos (ROBERTS; CAMPBELL, 1977), pois eles são incapazes de se protegerem das variações de temperatura através de sistemas fisiológicos (ALVES, 1982). Além de atributos como a alta produção, virulência e tolerância à radiação UV, o bom desempenho dos fungos no controle biológico depende também da termotolerância dos conídios, principalmente em regiões mais quentes, tanto no armazenamento, aumentando a vida de prateleira como no campo mantendo a viabilidade até entrar em contato com o hospedeiro.

#### 5.6 COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE AZOXISTROBINA E *BEAUVERIA BASSIANA*

O fungicida azoxistrobina afetou a viabilidade dos conídios avaliados neste estudo. A interação entre os sucessivos cultivos e os meios foi significativa, afetando o número de UFC e a germinação dos conídios dos isolados CG 152 e Unioeste 40 antes e após a exposição ao fungicida. Na avaliação da germinação, o isolado CG 152, cultivado em meio BDA e que não foi exposto ao fungicida, obteve a menor porcentagem de germinação após a segunda passagem pelo hospedeiro em 1°(B). Os conídios originados nos cultivos 1°(A) e 20° foram responsáveis pelos maiores valores, e não diferiram entre si. Para os conídios originados em MPE, os sucessivos cultivos, sem exposição ao fungicida, não afetaram a germinação, e ainda foram superiores aos conídios originados em BDA (Figura 10); (Apêndice G).

**Figura 10** – Germinação de *Beauveria bassiana* (CG 152) com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 4,16 %); Expostos ao fungicida (CV= 42,85 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

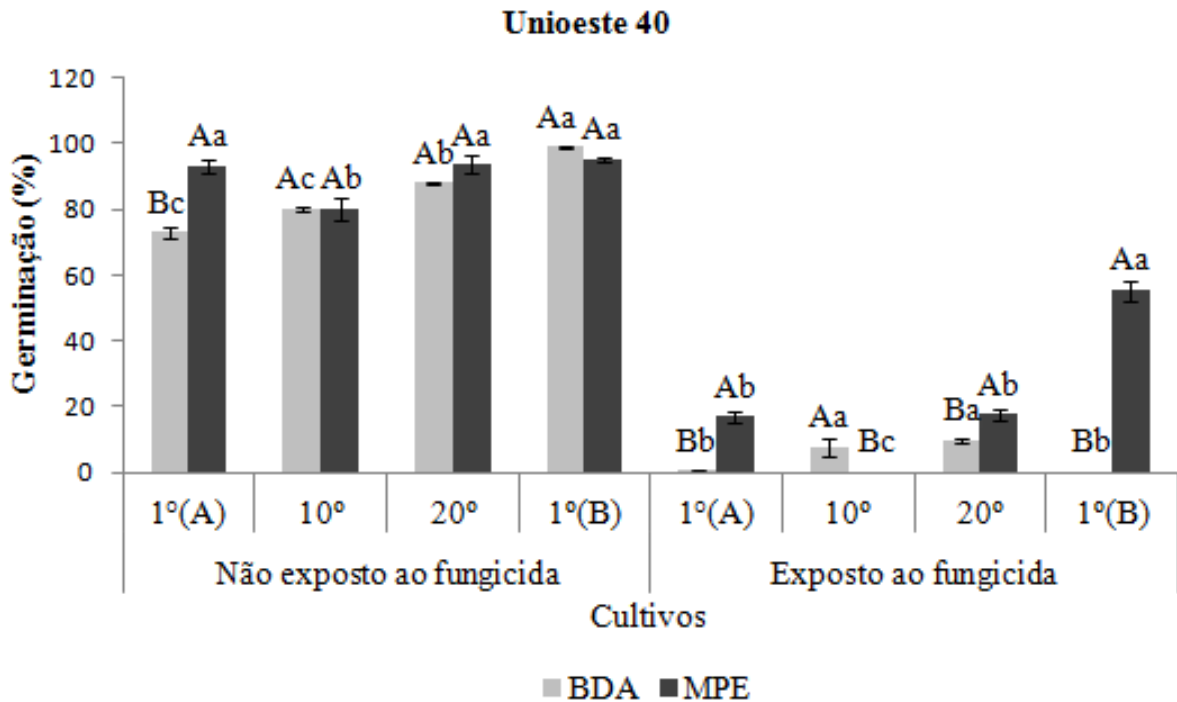


Os conídios do isolado CG 152, provenientes do meio BDA, expostos ao fungicida, obtiveram, de um modo geral, viabilidade inferior a 5 % e não diferiram entre os cultivos. Já em MPE, a passagem do fungo pelo hospedeiro favoreceu um aumento da tolerância ao fungicida nos cultivos 1°(A) e 1°(B). Na comparação entre os meios, os conídios originados em MPE obtiveram maior porcentagem de germinação no 1°(A) e 1°(B), e não diferiram de BDA no 10° e 20° cultivo. Assim, podemos inferir que o meio de cultivo pode interferir na sensibilidade do fungo ao fungicida.

Para o isolado Unioeste 40, os conídios não expostos ao fungicida, originados em meio BDA obtiveram as menores porcentagens de germinação nos cultivos 1°(A) e 10°, que não diferiram entre si. Já o maior valor foi obtido após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro, em 1°(B). Para os conídios provenientes de MPE, a menor germinação ocorreu para os conídios de 10° cultivo, não diferindo nos demais. Na comparação entre os meios, MPE foi superior ao BDA apenas no 1°(A) cultivo, originando

conídios mais tolerantes. Nos demais cultivos não houve diferença entre BDA e MPE (Figura 11) (Apêndice G).

**Figura 11** – Germinação de *Beauveria bassiana* (Unioeste 40) com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 4,44 %); Expostos ao fungicida (CV= 25,17 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Os conídios do isolado Unioeste 40, expostos ao fungicida, originados de cultivos em BDA, foram mais tolerantes no 10° e 20°. Para os conídios provenientes de MPE, não houve germinação no 10° cultivo. Em 1°(A) e 20° a viabilidade foi superior a do 10° cultivo, e não diferiram entre si. Após a segunda passagem pelo hospedeiro, em 1°(B), houve um aumento da tolerância dos conídios ao fungicida, com aproximadamente 55 % dos conídios viáveis. Na comparação entre os meios, a porcentagem de germinação foi maior para os conídios originados em MPE em todos os cultivos, exceto no 10°, onde o cultivo em meio BDA foi superior.

A maior tolerância ao fungicida, para CG 152 e Unioeste 40, na maioria dos cultivos foi observada para os conídios obtidos em MPE, o que indica que esse meio pode ter fornecido melhores condições nutricionais aos conídios, beneficiando-os de alguma forma,

que possibilitou sua germinação. Como exemplo, esse favorecimento pode ter ocorrido pelo acúmulo de nutrientes ou pela existência de alguma substância ou elemento essencial no processo de desintoxicação do fungo metabolizando o fungicida e aumentando a velocidade de germinação. Fato semelhante foi verificado por Francisco et al., (2006), que observaram a influência da composição do meio de cultivo na germinação de conídios de *B. bassiana*, a qual foi favorecida por meios nutricionalmente mais ricos.

Alguns produtos podem influenciar os fungos entomopatogênicos, afetando não só a viabilidade, mas também o crescimento vegetativo e a esporulação, ou até mesmo a composição genética, alterando a sua virulência (ALVES et al., 1998a). Entretanto, o efeito de alguns fungicidas sobre os fungos pode variar em função da espécie ou linhagem utilizada. Shapiro-Ilan et al., (2002) testaram a resistência de sete isolados de *B. bassiana* a fenbuconazole, e observaram que um dos isolados foi fortemente inibido pelo produto. No presente trabalho, os isolados se comportaram de maneira diferente, sendo que o cultivo em meio mais nutritivo e também a passagem do fungo pelo hospedeiro foram capazes de elevar a tolerância ao fungicida. Esse fato nunca foi avaliado antes em outros trabalhos, e é de extrema importância, pois manter e/ou aumentar a compatibilidade entre eles possibilita sua aplicação em conjunto ou sequencial, disponibilizando mais ferramentas para o manejo das populações de pragas.

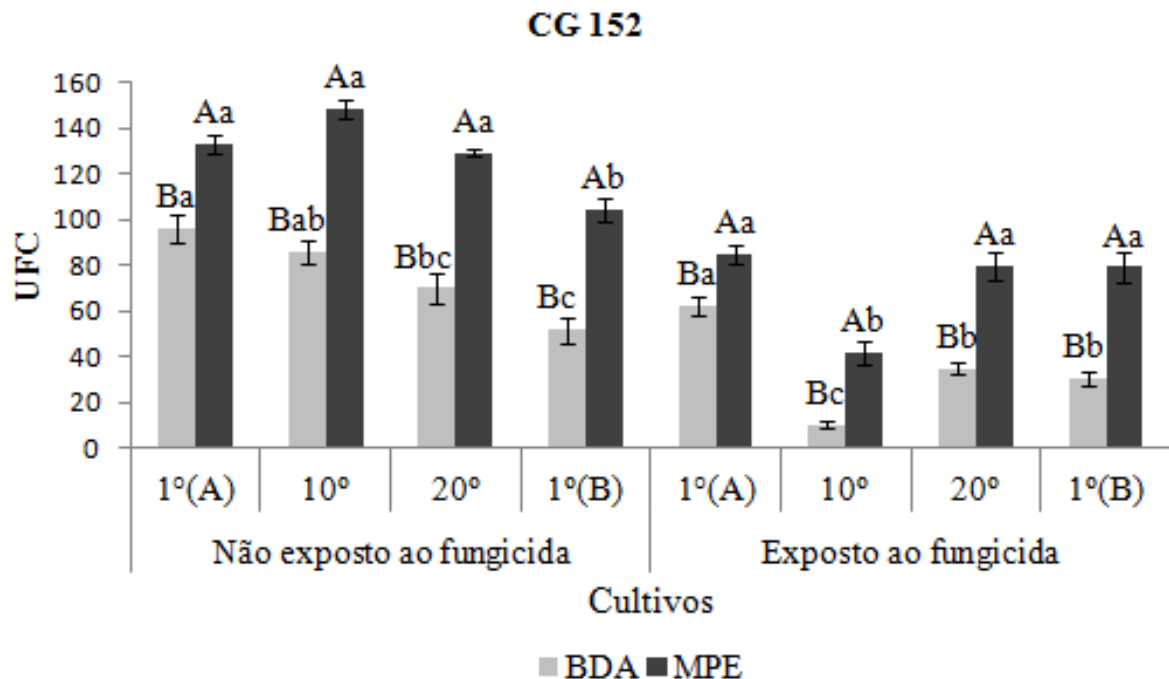
Os resultados obtidos mostram que azoxistrobina não foi compatível com os isolados CG 152 e Unioeste 40, pois afetou fortemente a germinação dos conídios. Esse parâmetro é o aspecto mais importante para avaliar a compatibilidade entre os produtos químicos e fungos entomopatogênicos (NEVES et al., 2001; HIROSE et al., 2001), visto que o início da infecção está relacionado à capacidade de germinação do fungo e sua penetração no hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2003). Para Boucias et al., (1988) o contato dos conídios com produtos químicos pode neutralizar a carga eletrostática da superfície, e/ou remover a camada mucosa que cobre os conídios, afetando o processo de reconhecimento do substrato e a transdução do sinal que inicia a germinação. St. Leger et al., (1991) também demonstraram os efeitos da remoção dessa mucosa na transdução do sinal que desencadeia a formação do tubo germinativo em *M. anisopliae*.

Apesar da grande importância em se avaliar a germinação dos conídios em ensaios de compatibilidade, é necessário também estimar o número de UFC, pois os produtos químicos podem causar apenas um atraso na germinação dos conídios sobreviventes, sem afetar a viabilidade, o que pode ser avaliado pela quantificação das UFC (SILVA; NEVES, 2005).

Para esta variável (UFC), a interação entre os meios e os sucessivos cultivos foi significativa para os conídios expostos e não expostos ao fungicida. A redução do número de UFC para os conídios expostos ao fungicida foi menos acentuada que a redução da germinação, o que mostra que nem todos os conídios que não germinaram estavam inviáveis e que pode ter ocorrido apenas um atraso da germinação.

Para o isolado CG 152, proveniente do meio BDA, e que não foi exposto ao fungicida, a quantidade de UFC decresceu na medida em que aumentaram os sucessivos cultivos, não havendo aumento após a segunda passagem do fungo pelo hospedeiro no cultivo 1°(B), que apresentou uma redução de 46 % em relação ao 1°(A) cultivo. Os conídios originados em MPE mantiveram o número de UFC em todos os cultivos, diminuindo apenas no 1°(B) (Figura 12); (Apêndice H).

**Figura 12** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (CG 152) com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 11,35 %); Expostos ao fungicida (CV= 16,35 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

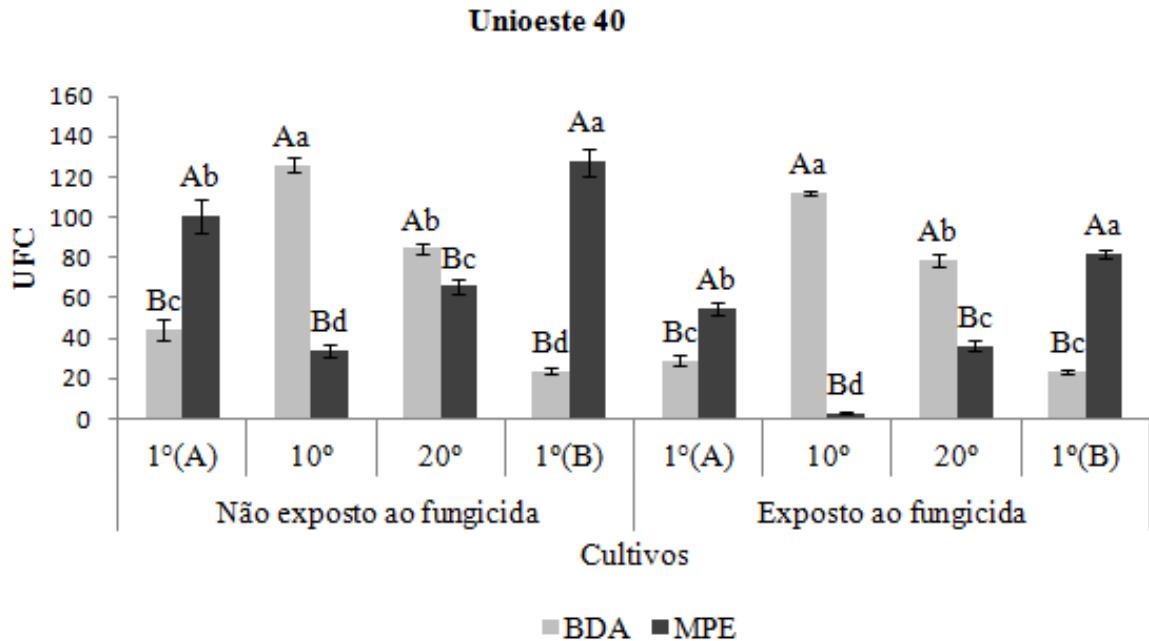


Após o contato com o fungicida, a maior tolerância observada nos conídios de CG 152, originados em BDA ocorreu no cultivo 1º(A), já os mais sensíveis foram os do 10º cultivo. Em meio MPE, houve manutenção na quantidade de UFC em todos os cultivos, exceto para os de 10º, onde a redução chegou a aproximadamente 50 %. Na comparação entre os meios, os conídios originados em MPE foram menos afetados pelo fungicida em todos os cultivos.

Observando o número de UFC obtido dos conídios expostos e não expostos ao fungicida, foi possível notar a sensibilidade do isolado CG 152 ao produto químico em todos os cultivos, especialmente no 10º, onde os conídios originados tanto em meio BDA, como em MPE foram os mais sensíveis ao fungicida. Esse fato, que também ocorreu na germinação, pode estar relacionado com as sucessivas passagens do fungo pelo meio de cultivo, entretanto, após um maior número de passagens, o fungo pode ter se adaptado as condições nutricionais, refletindo em maior tolerância a efeitos danosos.

Para o isolado Unioeste 40, produzido em meio BDA e não expostos ao fungicida houve diferença no número de UFC em todos os cultivos, sendo que o maior ocorreu no 10º, e o menor no 1º(B). O contrário ocorreu para os conídios originados em MPE, onde a viabilidade foi maior em 1º(B), e menor no 10º cultivo. Na comparação entre os meios, os conídios cultivados em MPE foram superiores a BDA em 1º(A) e 1º(B), e o inverso ocorreu para os de 10º e 20º (Figura 13); (Apêndice H).

**Figura 13** – Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Beauveria bassiana* (Unioeste 40) com conídios provenientes de cultivos sucessivos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e MPE (Meio para Produção de Esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina; letras minúsculas comparam os cultivos em um mesmo meio, e as maiúsculas comparam os meios em um mesmo cultivo, (Tukey,  $p < 0,05$ ); Não expostos ao fungicida (CV= 14,90 %); Expostos ao fungicida (CV= 10,15 %); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.



Após a exposição ao fungicida, os conídios oriundos de BDA também sofreram alteração no número de UFC com os sucessivos cultivos. Semelhante ao que ocorreu com os conídios não expostos ao fungicida, os de 10° cultivo foram responsáveis pelo maior número de UFC, e os de 1°(B) e 1°(A), obtiveram os menores valores. Para os conídios originados em MPE, os de 1°(B), seguidos dos de 1°(A) cultivo, foram os mais tolerantes, já para os de 10°, observou-se o menor número de UFC. Na comparação entre os meios, MPE proporcionou maior tolerância em 1°(A) e 1°(B), e BDA melhor tolerância para os conídios de 10° e 20°.

Existe variabilidade entre as respostas de diferentes isolados pertencentes a uma mesma espécie de fungo entomopatogênico em relação a diversos parâmetros biológicos, inclusive para a sensibilidade a produtos químicos sintéticos (OLMERT; KENNETH, 1974; PACCOLA-MEIRELES; AZEVEDO, 1990; LIU et al., 1993), o que pode estar ligado a diversidade genética existente entre eles. Neste trabalho observou-se que, além da variabilidade genética, as condições de cultivo, o número de vezes em que o fungo é cultivado

*in vitro* e a passagem pelo hospedeiro são fatores que influenciam a sensibilidade do fungo ao fungicida.

Para os dois isolados avaliados nesse estudo houve grande redução na germinação dos conídios após o contato com o fungicida, entretanto o número de UFC foi menos afetado. Essas diferenças podem ser devido à redução do efeito dos produtos aos conídios ao longo do tempo, pois a germinação foi avaliada com 20 horas, enquanto as UFC foram avaliadas após quatro dias. Da mesma maneira, Griffin (1994) também observou que os efeitos de muitos inseticidas sobre o crescimento do fungo podem diminuir gradualmente ao longo do tempo. Esse fato pode explicar o atraso na germinação dos conídios ocorrido nesse trabalho, os quais podem ter levado um tempo maior para formar o tubo germinativo após o contato com o produto.

Alguns trabalhos afirmam que a germinação dos conídios é mais severamente afetada do que o crescimento vegetativo na presença de pesticidas (HALL, 1981; ER; GOKCE, 2004). Resultados semelhantes ocorreram com a utilização do fungicida azoxistrobina, que também influenciou fortemente a germinação de *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & Gams, mas não afetou o crescimento micelial quando aplicado na dose de recomenda (KIM et al., 2001).

A incompatibilidade entre o fungo e alguns pesticidas, pode ocorrer quando tanto a germinação, quanto o número de UFC são afetados após o contato com o fungicida. Esse fato foi observado para Unioeste 40 no 10º cultivo em meio MPE e nos cultivos 1º(A) e 1º(B) em BDA, e para o isolado CG 152 no 10º em BDA. Os conídios originados nesses cultivos obtiveram os menores valores de germinação e UFC, sugerindo não ser apenas um atraso na germinação, e sim a total inativação dos conídios pelo fungicida.

Os pesticidas utilizados em lavouras podem ter efeitos antagônicos, nulos ou sinérgicos sobre a atividade inseticida/acaricida dos entomopatógenos presentes no agroecossistema (BENZ, 1987). A seletividade de produtos químicos sobre as diversas fases de desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos, assim como manter a compatibilidade entre eles após sucessivos cultivos *in vitro* do fungo, é essencial em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), principalmente quando os fungos produzidos em larga escala, são aplicados a campo de modo inundativo, associado ou não a produtos fitossanitários (ANDERSON; ROBERTS, 1983; NEVES et al., 2001).

O sucesso dos fungos no controle de pragas depende da viabilidade dos conídios (BATISTA FILHO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2004). Nesse estudo foi verificada elevada porcentagem de redução na viabilidade dos conídios após a exposição ao fungicida.

No entanto, os resultados podem diferir em campo, pois os testes *in vitro* expõem os conídios ao produto de uma forma que não ocorre a campo. Além disso, os fungos podem não ser afetados depois que os produtos já foram degradados nas folhas. Portanto, se o produto mostrou-se seletivo no laboratório, também deve ser em condições de campo. Por outro lado, alta toxicidade *in vitro* nem sempre se repete a campo (BUTT; BROWNBRIDGE, 1997).

## 6 CONCLUSÃO

Os cultivos sucessivos de *B. bassiana in vitro* e as condições nutricionais do meio afetam o crescimento vegetativo e produção de conídios, a virulência, tolerância à temperatura e à radiação UV e a sensibilidade ao fungicida azoxistrobina, com respostas diferentes entre os isolados.

Pode ocorrer redução do crescimento vegetativo e da produção de conídios em meio de cultivo após sucessivos cultivos, porém, esta característica é dependente do isolado e do meio onde o fungo é cultivado. Conídios de *B. bassiana* cultivados em MPE apresentam maior crescimento vegetativo e são mais produtivos, tanto em arroz, como em meio de cultivo. O isolado CG 152 é mais estável do que o Unioeste 40 após os sucessivos cultivos e também garante maior produtividade em arroz.

A tolerância à radiação UV e à temperatura elevada (30 °C) foi afetada após os sucessivos cultivos. Os maiores níveis de tolerância após as condições de estresse foram obtidos pelo isolado CG 152, cultivado em MPE, e Unioeste 40, em BDA, mostrando a variabilidade entre os isolados e a influência dos meios.

A virulência pode ser atenuada após os cultivos sucessivos, entretanto isso varia entre isolados.

O fungicida azoxistrobina reduz a germinação dos conídios de ambos isolados, entretanto o número de UFC é menos afetado, sugerindo apenas um atraso na germinação. A tolerância de *B. bassiana* a azoxistrobina é reduzida após sucessivos cultivos em ambos os meios, e pode ser parcialmente restaurada após a passagem dos conídios pelo hospedeiro.

As características de crescimento vegetativo, produção de conídios, tolerância à temperatura e à radiação UV, que são atenuadas pelos cultivos sucessivos, podem ser restauradas após a passagem do fungo pelo hospedeiro, entretanto, isso depende do isolado e do meio onde ocorreram os cultivos.

## 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.
- AIZAWA, K. 1971. Strain improvement and preservation of virulence. In : BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.). **Microbial Control of Insects and Mites**. New York: Academic Press, 1960. p. 666–668.
- ALVES, S. B. **Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.** 1982. 95 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986. 407p.
- 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.; 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, 2008a. 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, 2008b. p.21-48.
- 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. (eds.) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008c. 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.
- ALVES, S.B.; ROSSI, L.S.; LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.81, n.4, p.70-77, 2002

- ANDERSON, T. E.; ROBERTS, D. W. Compatibility of *Beauveria bassiana* Isolate with Insecticide Formulations Used in Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis Road, v.76, p.1437-1441, 1983.
- ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). **Anvisa**, Brasília, 2010. 22p.
- 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.
- BARBOSA, P. **Conservation Biological Control**. New York: Academic Press, 1998. 396 p.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A.; PEREIRA, R.M.; AUGUSTO, N.T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 917-967.
- BENZ, G. Environment. In: FUXA, R.; TANADA, Y. (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley, 1987. p.177-214.
- BERG, D. Biochemical mode of action of fungicides – ergosterol biosynthesis inhibitors. In: GREEN, M.B.; SPILKER, D.A. (Ed.). **Fungicide Chemistry Advances and Practical Applications**. Washington, DC: American Chemical Society, 1986. p. 2–31.
- BIDOCHKA, M.J.; St. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.213-224, 1997.
- 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. General properties of fungal pathogens. In: BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. **Principles of insects pathology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.259-283.
- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p.1795-1805, 1988.
- 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.; 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.; 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.; BROWNBIDGE, M. 1997. Fungal pathogens of thrips. In: LEWIS, T. (Ed.) **Thrips as crop pests**. Wallingford, UK. CAB international, 1997, p. 399-433.

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 potencial**. New York: CAB, 2001. 390p.

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.

CAVAGUCHI, S.A. **Seleção e caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill submetidos ao contato com o fungicida azoxistrobina**. 2008. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

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.

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.

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.

CRAWFORD, P.J.; BROOKS, W.M.; ARENDS, J.J. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) as microbial control agents of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v.91, p.1295-1301, 1998.

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.

DAOUST, R.A.; ROBERTS, 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.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; MUEKE, J.M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biocontrol**, v.49, p.83-94, 2004.

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.

EKESI, S. et al. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 83, n.2, p.157-167, 2003.

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.

ER, M.K.; GOKCE, A. Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. **Journal of Biological Control**, v.31, n. 3, p. 398-404, 2004.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; ITIER, B. Effet du rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycète entomopathogène, *Nomuraea rileyi*, à la surface d'un couvert végétal. **Entomophaga**, v.33, p.357-370, 1988.

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.

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.F.; ROBERT, P.H. Effects of passaging through scarabaeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p. 576-583, 1983.

- 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.
- 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.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, USA. 1994.
- GUAGLIUMI, P. As cigarrinhas dos canaviais no Brasil. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p. 34-43, set. 1968.
- 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.
- HALL, R.A. Laboratory studies on the effects of fungicides, acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.29, n. 1, p. 39-48, 1981.

- 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.
- HASSAN, S.A.; BIGLER, F.; BONGENSHUTZ, H.; BOLLER, E., BRUN, J.; CALIS, J.N.M. Results on the fifth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-working group pesticide and beneficial organisms. **Entomophaga**. v.36, p.55-67, 1991.
- 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.
- HEINRICH, B. **The hot-blooded insects**. Cambridge: Harvard University Press, 1993. p.601.
- HEINRICH, B. Insect thermoregulation. **Endeavour**, Oxford, v.19, p.28-33, 1995.
- HIROSE, E.; NEVES, P.M.O.J.; ZEQUI, J.A.; MARTINS, C.L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO, A. Effect of biofertilizers and Neem Oil on the Entomopatogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 419-423, 2001.
- 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.
- HUMBER, R.A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.98, p.262-266, 2008.
- 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.
- JACKSON, M.A.; SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BOYETTE, C.D.; SILMAN, R.W.; BOTHAST, R.J. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, v.10, p.645-650, 1996.
- JIN, X.; STREETT, D. A.; DUNLAP, C. A.; LYN, M. E. Application of hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 226-233, 2008.
- JONES, K. A., BURGESS, H. D.. Technology of formulation and application. In: BURGESS, H. D (Ed.). **Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments**. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.7-30.
- 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.
- KAWAKAMI, K. On the changes of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. **Bulletin Sericultural Experimental Station**, Japon, v.16, p.83-99, 1960.

- 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.
- KHACHATOURIANS, G.G. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: ARORA, D.K.; AJELLO, L.; MUKERJI, K.G.(Ed.) **Handbook of Applied Mycology**, New York : Marcel Dekker, Inc., 1991. v. 2, p. 613-663.
- KIM J J.; LEE, M.H.; YOON, S.C. Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen.. Biological Control of Greenhouse Pests. **Food and Fertilizer Technology Center** Extension Bulletin, 2001. Disponível em: <<http://www.fftc.agnet.org/library.php?func=view&id=20110712071641>>. Acesso em: 08 jan. 2012
- KIM, J.S., LEE, H.Y., CHUNG, B.J., JE, Y.H. Method for enhancing the thermal tolerance of entomopathogenic fungal spores, blastospores and enzymes. **PCT Patent Publication** No. WO/2008/063011 (Korean Patent No. 10-0835689- 0000), 2008.
- 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.
- 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.
- LATCH, G.C.M. Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinoceros* to some entomogenous fungi. **Entomophaga**. v.21, n.1, p.31-38, 1976.
- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto, 2003. 92p.
- LELAND, J.E.; BEHLE, R.W. Coating *Beauveria bassiana* with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). **Biocontrol Science and Technology**, v.15, p.309-320, 2005.
- 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.
- LIU, Z.Y.; MILNER, R.J.; MCRAE, C.F.; LUTTON, G.G. The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.62, p.248-251, 1993.
- LOUREIRO, E. S.; MOINO, A.; AMOSTI, A.; SOUZA, G.C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology** v.31, n.2, p.263- 269, 2002.

- MAGAN, N. Fungi in extreme environments. In: WICKLOW, D.T.; SODERSTROM, B.E. **Environmental and Microbial Relationships**. New York: Springer, 1997.
- MAJCHROWICZ, I.; POPRAWSKI, T.J. Effects of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**. v.3, p.321–336, 1993.
- 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.
- MOINO JUNIOR, A. **Introdução ao Manejo Integrado de Pragas**. Lavras: UFLA, 2000.
- MOINO JUNIOR., A.; SAAD, M.C.; ALVES, S.B. Ação tóxica de defensivos utilizados na cultura dos citros sobre fungos entomopatogênicos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESALQ, 4., 1989, Piracicaba. **Resumos**. Piracicaba: ESALQ, p.53, 1989.
- 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.
- 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.
- MUGNAI, L.; BRIGDE, P.D.; EVANS, H.C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v.92, p.199-209, 1989.
- 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.
- NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P.T.; MOINO, J.A. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. **Neotropical Entomology**. v.30, p.263-268, 2001.
- OLIVEIRA, R.C.; NEVES, P.M.O.J. Compatibility of *Beauveria bassiana* with Acaricides. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 3, p.353-358, 2004.
- OLIVEIRA, G.N., NEVES, P.M.O.J.; KAWAZOE, L.S. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 663-667, 2003.

OLMERT, I.; KENNETH, R.G. Sensitivity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* and *Verticillium* sp. To fungicides and insecticides.

**Environmental Entomology**, v. 3, p.33-39, 1974

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.

PACCOLA-MEIRELES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural no fungo

entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.33, n.3, p.657-672, 1990.

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.

POLAR, P.; DE MURO, M.A.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.A.

ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks.

**Veterinary Parasitology**, v.134, p.159-167, 2005.

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.
- RANGEL, D.E.N.; BYTLER, M.J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A.J.; BRAGA, G.U.L.; DAY, A.W.; ROBERTS, D.W. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, p.170-182, 2006.
- RATH, A.C. Ecology of entomopathogenic fungi in field soils. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8. 2002, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu: 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.
- 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.
- REIS, R. C. S.; MELO, D. R. de; PERINOTTO, W. M. de S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade in vitro de formulações fúngicas sobre ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 101-105, 2005.
- ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.A. Stability of entomopathogenic fungi. In: IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L. **Environmental Stability of Microbial Insecticides**. Lanham: Entomological Society of America. p. 19-76, 1977.
- 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.
- SANTORO, P.H. **Influência da nutrição e de sucessivos cultivos in vivo e in vitro sobre parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.** 2011. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- 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.

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, 2001, p.93-152.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Heat killing of *Bacillus subtilis* spores in water is not due to oxidative damage. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.4109-4112, 1998.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.3486-3495, 1996.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4109-4112, 1995.

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.

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.; ANSARI, M.A.; WATKINS, J.; PHELPS, Z.; CROSS, J.; BUTT, T.M.; Influence of commercial fungicides on the germination, growth and virulence of four species of entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**. v.19, p.743-753, 2009.

SHAPIRO-LLAN, D.I.; REILLY, C.C.; HOTCHKISS, M.W.; WOOD, B.W. The potential for enhanced fungicide resistance in *Beauveria bassiana* through strain and artificial selection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, p.86-93, 2002.

SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *in vitro* phytosanitary products. **Pest Management Science**. v. 61, n. 7, p.667-674, 2005.

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

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.

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.

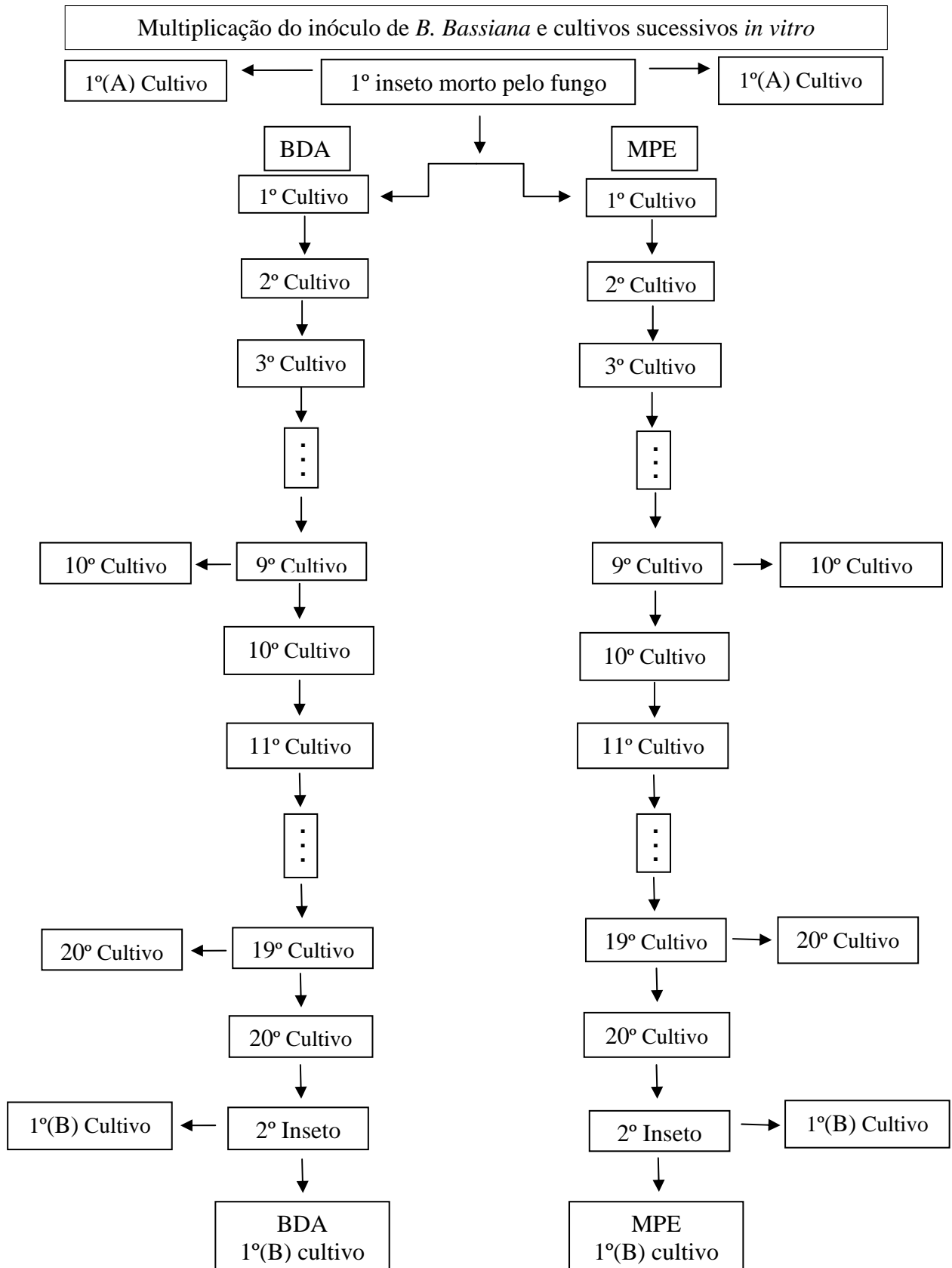
SOSA-GOMES, D.R.; MOSCARDI, F. Importância das interações entre agroquímicos e entomopatógenos em programas de MIP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, SP. **Resumos**. São Pedro. p.59, 2003.

- St. LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C.; Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.168-179, 1991.
- St. LEGER, R. J., JOSHI, L., ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.2, p.709-713, fev. 1998.
- TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; FAION, M.; LOPES, R.B.; PADULLA, L.F.L. Padulla. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.69, p.89-96, 2002.
- THOMAS, S.R., ELKINTON, J.S. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.85, p.146–151, 2004.
- TODOROVA, S.I., CODERRE, D.R.M. DUCHESNE, J.C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicide and herbicides. **Environmental Entomology**. v.27, n.2, p.427–433, 1998
- 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.
- 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.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Figura 1



## APÊNDICE B

Tabela 1

**Tabela 1** - Crescimento vegetativo (cm<sup>2</sup>) e produção de conídios (x10<sup>7</sup> conídios colônia<sup>-1</sup>) *in vitro* de *Beauveria bassiana*, proveniente de sucessivos cultivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporos), após 10 dias de incubação (25°C±2, fotofase de 12 horas).

Isolado	Cultivo	<sup>1</sup> Crescimento Vegetativo (cm <sup>2</sup> )				<sup>1</sup> Produção (conídios colônia <sup>-1</sup> ) X10 <sup>7</sup>			
		BDA		MPE		BDA		MPE	
CG152	1°(A)	21.57±1.93	Aa	25.17±0.66	Aa	144,60±33,80	Bab	304,30±74,59	Aa
	10°	15.77±0.41	Ba	24.36±1.46	Aa	49,20±10,75	Bb	383,00±71,32	Aa
	20°	16.74±2.19	Aa	17.22±2.38	Ab	258,10±38,82	Aa	236,00±40,74	Aa
	1°(B)	14.92±2.15	Ba	27.14±2.18	Aa	170,98±39,81	Aab	212,10±28,30	Aa
Unioeste 40	1°(A)	21.42±0.79	Aa	17.16±1.39	Bb	51,90±5,84	Bc	126,60±17,56	Aab
	10°	22.58±0.77	Aa	24.09±0.21	Aa	230,10±31,57	Ab	196,80±24,78	Aa
	20°	17.51±0.68	Ab	18.73±0.81	Ab	40,90±6,90	Bc	102,40±18,89	Ab
	1°(B)	20.67±1.47	Bab	23.40±0.21	Aa	317,30±25,00	Aa	184,60±26,20	Ba

<sup>1</sup> Médias (± EP) seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, para uma mesma variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); [CG 152 (CV=19,85%) e (CV=47,40%); Unioeste 40 (CV=9,70%) e (CV=30,55%), para crescimento vegetativo e produção respectivamente]; 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem por *A. diaperinus*; 1°(B) primeiro cultivo em meio após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

## APÊNDICE C

Tabela 2

**Tabela 2** - Produção de conídios de *Beauveria bassiana* ( $\times 10^7$  conídios  $g^{-1}$ ) em arroz cozido, inoculado com conídios provenientes de sucessivos cultivos em meio BDA (meio de batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporos), após 15 dias de incubação ( $25 \pm 1^\circ C$  e fotofase de 12 horas).

Cultivo	<sup>1</sup> CG 152		<sup>1</sup> Unioeste 40	
	BDA	MPE	BDA	MPE
1°(A)	35,88 $\pm$ 7,96 Bab	59,83 $\pm$ 0,78 Ab	1,83 $\pm$ 0,29 Ba	9,61 $\pm$ 0,80 Ab
10°	26,57 $\pm$ 2,97 Bbc	63,95 $\pm$ 7,16 Ab	3,08 $\pm$ 0,78 Ba	14,71 $\pm$ 2,38 Ab
20°	11,33 $\pm$ 3,37 Bc	92,51 $\pm$ 10,48 Aa	4,58 $\pm$ 0,98 Ba	44,50 $\pm$ 6,68 Aa
1°(B)	57,06 $\pm$ 1,98 Ba	88,54 $\pm$ 6,31 Aa	7,56 $\pm$ 0,26 Ba	30,42 $\pm$ 7,38 Aa

<sup>1</sup> Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); [CG 152 (CV=22,07 %), Unioeste 40 (CV= 50,34 %)]; 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem por *A. diaperinus*; 1°(B) primeiro cultivo em meio após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

## APÊNDICE D

Tabela 3

**Tabela 3** - Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* por conídios de *Beauveria bassiana*, provenientes de sucessivos cultivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporos), ao décimo dia após a aplicação.

Isolado	Cultivo	<sup>1</sup> Mortalidade Total (%)				<sup>1</sup> Mortalidade Confirmada (%)			
		BDA		ME		BDA		ME	
CG152	1°(A)	35,33±7,09	Aa	29,33±3,33	Aa	33,00±6,69	Aa	28,00±2,87	Aa
	10°	24,00±4,98	Ba	37,33±4,15	Aa	21,67±5,10	Ba	36,67±3,78	Aa
	20°	30,00±3,61	Aa	33,67±5,35	Aa	27,67±3,88	Aa	32,67±5,43	Aa
	1°(B)	31,67±2,50	Aa	31,33±3,45	Aa	26,00±3,97	Aa	30,00±3,72	Aa
	Testemunha	4,00±0,89*				0,00±0,00*			
Unioeste 40	1°(A)	33,00±2,05	Ab	34,67±2,51	Aa	27,33±4,78	Ab	32,33±2,89	Aa
	10°	32,33±4,48	Ab	38,33±4,99	Aa	28,33±4,11	Ab	38,00±5,86	Aa
	20°	48,33±2,15	Aa	46,67±5,36	Aa	46,00±2,13	Aa	39,00±5,10	Aa
	1°(B)	43,67±3,07	Aab	36,00±5,01	Aa	38,00±5,77	Aab	33,67±5,10	Aa
	Testemunha	4,00±0,89*				0,00±0,00*			

<sup>1</sup> Médias (± EP) seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada mortalidade, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); CG152 (CV=35,04%) e (CV=38,04%); Unioeste 40 (CV=24,59%) e (CV=32,19%) para mortalidade total e confirmada, respectivamente]; \* difere dos demais tratamentos, para cada tipo de mortalidade, pelo teste de Dunnett (p<0,05); 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem por *A. diaperinus*; 1°(B) primeiro cultivo em meio após 20 passagens em meio e uma passagem pelo hospedeiro.

## APÊNDICE E

Tabela 4

**Tabela 4** Unidades formadoras de colônias de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de sucessivos cultivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporos), não expostos e expostos à radiação ultravioleta por 1 minuto.

Isolado	Cultivo	<sup>1</sup> Não expostos à UV				<sup>1</sup> Expostos à UV			
		BDA		MPE		BDA		MPE	
CG 152	1°(A)	45.50±2.10	Bb	56.67±1.97	Ab	16.83±2.19	Aa	23.00±3.58	Aa
	10°	27.83±3.70	Bc	60.50±5.64	Ab	7.83±2.05	Bb	15.50±2.90	Aa
	20°	45.50±2.92	Ab	52.83±3.11	Ab	7.83±0.95	Bb	17.33±2.54	Aa
	1°(B)	81.17±3.91	Aa	78.50±2.94	Aa	10.33±1.99	Aab	16.33±1.50	Aa
Unioeste 40	1°(A)	26.50±3.32	Bab	65.33±3,51	Aa	14.67±3.17	Aa	10.17±4.32	Ab
	10°	22.67±1.03	Bb	36.17±3.71	Ab	6.50±0.93	Aa	7.67±2.85	Ab
	20°	37.33±1.65	Aa	40.50±3.42	Ab	9.83±1.67	Aa	6.17±2.41	Ab
	1°(B)	34.00±2.55	Ba	66.17±3.20	Aa	7.67±1.75	Ba	26.17±2.66	Aa

<sup>1</sup> Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); [CG 152 (CV=15,07%) e (CV=39,69%); Unioeste 40 (CV=17,49%) e (CV=58,34%), para não expostos à UV e expostos à UV respectivamente]; 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem por *A. diaperinus*; 1°(B) primeiro cultivo em meio após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

## APÊNDICE F

Tabela 5

**Tabela 5** - Unidades formadoras de colônias de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de sucessivos cultivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e ME (meio de *Alphitobius diaperinus*), após armazenagem a 30°C por 15 dias.

Isolado	Cultivo	Não expostos a 30°C <sup>1</sup>				Expostos a 30°C <sup>11</sup>			
		BDA		MPE		BDA		MPE	
CG 152	1°(A)	24,60±2,05	Bc	123,00±1,65	Ab	28,20±0,86	Ab	7,40±0,25	Bc
	10°	50,40±7,41	Bb	116,00±3,59	Ab	18,00±2,13	Bc	35,40±1,97	Ab
	20°	48,00±2,71	Bb	119,20±3,85	Ab	21,60±0,68	Bbc	63,20±3,45	Aa
	1°(B)	236,20±4,20	Aa	181,20±5,77	Ba	77,60±3,81	Aa	65,25±3,00	Ba
UNI 40	1°(A)	109,25±2,86	Ab	91,60±4,84	Bb	10,20±0,92	Abc	3,60±1,29	Ba
	10°	47,80±3,38	Ac	18,00±0,63	Bd	12,60±0,68	Ab	1,40±0,25	Ba
	20°	39,00±3,12	Ac	49,40±3,15	Ac	19,00±1,59	Aa	1,40±0,25	Ba
	1°(B)	128,00±8,48	Aa	115,00±4,75	Ba	19,00±0,71	Aa	1,80±0,20	Ba

<sup>1</sup> Médias ( $\pm$  EP) seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, para um mesmo tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); [CG 152 (CV=8,53%) e (CV=13,38%); Unioeste 40 (CV=13,23%) e (CV=26,52%), para não expostos a 30°C e expostos a 30°C respectivamente] ; 1°(B) primeiro cultivo em meio após a passagem por *A. diaperinus*; 1°(B) primeiro cultivo em meio após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

## APÊNDICE G

Tabela 6

**Tabela 6-** Germinação (%) de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de sucessivos cultivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina.

Isolado	Cultivo	<sup>1</sup> Não exposto ao fungicida				<sup>1</sup> Exposto ao fungicida			
		BDA		ME		BDA		ME	
CG 152	1°(A)	86,75±1,88	Ba	93,73±1,44	Aa	5,01±1,76	Ba	24,40±3,05	Ab
	10°	75,09±1,32	Bb	99,12±0,34	Aa	0,72±0,46	Aa	0,00±0,00	Ac
	20°	87,46±2,86	Ba	97,71±0,73	Aa	4,67±1,58	Aa	1,17±0,45	Ac
	1°(B)	57,72±2,99	Bc	95,46±0,97	Aa	0,00±0,00	Ba	35,20±3,66	Aa
UNI 40	1°(A)	73,01±1,71	Bc	93,08±2,32	Aa	0,44±0,26	Bb	16,92±1,60	Ab
	10°	80,00±0,89	Ac	80,13±3,52	Ab	7,77±2,74	Aa	0,00±0,00	Bc
	20°	88,08±0,53	Ab	93,56±2,79	Aa	9,72±0,70	Ba	17,63±1,63	Ab
	1°(B)	99,02±0,36	Aa	95,10±0,84	Aa	0,00±0,00	Bb	55,38±3,12	Aa

<sup>1</sup>Médias (± erro padrão) seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); [CG 152 (CV=15,07%) e (CV=39,69%); Unioeste 40 (CV=4,44%) e (CV=25,17%), para não expostos ao fungicida e expostos ao fungicida respectivamente]; 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.

## APÊNDICE H

Tabela 7

**Tabela 7-** Unidades formadoras de colônias de *Beauveria bassiana*, com conídios provenientes de sucessivos cultivos em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e MPE (meio para produção de esporos), não expostos e expostos ao fungicida azoxistrobina.

Isolado	Cultivo	<sup>1</sup> Não exposto ao fungicida				<sup>1</sup> Exposto ao fungicida			
		BDA		ME		BDA		ME	
CG 152	1°(A)	96,25±6,22	Ba	133,2±4,33	Aa	62,60±3,98	Ba	84,60±4,28	Aa
	10°	86,2±5,22	Bab	148,4±4,58	Aa	10,4±1,21	Bc	41,6±5,15	Ab
	20°	70,00±6,94	Bbc	129,00±1,62	Aa	34,80±2,44	Bb	79,80±6,52	Aa
	1°(B)	51,80±5,76	Bc	104,00±5,24	Ab	30,40±3,18	Bb	79,20±6,52	Aa
Unioeste 40	1°(A)	44,60±5,08	Bc	100,80±8,66	Ab	29,20±2,21	Bc	54,80±3,32	Ab
	10°	127,00±3,64	Aa	35,00±3,40	Bd	112,00±1,14	Aa	3,00±0,90	Bd
	20°	84,60±2,47	Ab	65,80±3,74	Bc	79,00±3,42	Ab	36,50±2,91	Bc
	1°(B)	24,00±1,77	Bd	127,40±6,91	Aa	23,40±1,51	Bc	82,00±2,29	Aa

<sup>1</sup> Médias (± erro padrão) seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); [CG 152 (CV=11,35%) e (CV=16,35%); Unioeste 40 (CV=14,40%) e (CV=10,15%), para não expostos ao fungicida e expostos ao fungicida respectivamente]; 1°(A) primeiro cultivo em meio após a passagem pelo hospedeiro; 1°(B) primeiro cultivo em meio, após 20 passagens em meios e uma passagem pelo hospedeiro.