



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SILVIA AKIMI CAVAGUCHI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.
SUBMETIDOS AO CONTATO COM O FUNGICIDA
AZOXISTROBINA**

Londrina
2008

SILVIA AKIMI CAVAGUCHI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.
SUBMETIDOS AO CONTATO COM O FUNGICIDA
AZOXISTROBINA**

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(a): Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves.

Londrina
2008

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C376s Cavaguchi, Silvia Akimi.
Seleção e caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. submetidos ao contato com o fungicida azoxistrobina / Silvia Akimi Cavaguchi. – Londrina, 2008.
82f. : 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, 2008.

Inclui bibliografia.

1. *Beauveria bassiana* – Teses. 2. Pragas agrícolas – Controle biológico – Teses. 3. Fungos entomopatogênicos – Teses. 4. Resistência a fungicidas – 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

SILVIA AKIMI CAVAGUCHI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. SUBMETIDOS AO CONTATO COM
O FUNGICIDA AZOXISTROBINA**

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

Profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes
Trindade Vilas Boas – UEL

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago (Suplente)
UEL

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez EMBRAPA

Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves (Suplente)
UNIOESTE

Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves
Orientador
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de fevereiro de 2008.

Aos meus pais, Sakuzo e Márcia Cavaguchi,
pelo amor, apoio e confiança
em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Como reconhecimento da minha formação acadêmica, desejo expressar meus agradecimentos àquelas pessoas que fizeram parte desta fase de minha vida:

Em primeiro lugar a Deus, por me conceder saúde, força, proteção e oportunidade de estar completando mais esta etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Manuel de Oliveira Janeiro Neves, pela orientação dedicada e paciente, pelo apoio, paciência e compreensão ao longo da execução deste trabalho.

Ao programa de bolsas CAPES, por proporcionar a dedicação exclusiva no desenvolvimento do trabalho de dissertação.

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Agronomia, pela oportunidade oferecida no curso de Mestrado. Em especial, aos professores Carmem Neves, Hideaki Takahashi, Lúcia Takahashi, Maurício Ventura, Maria de Fátima, Lindalva Maduenho da FAFICOP, a profa. Geni Varéa e Sueli da Bioquímica e a profa. Inês Fonseca pela estatística.

À professora Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro e sua aluna Francine pelo apoio oferecido para a realização da caracterização molecular.

À secretária da pós- graduação Wedda, pela eficiência na prestação de serviço e pela amizade.

Aos amigos de laboratório Paty, Bruno, Vaneide, Kelly, Junio, Adriana, Aline, Davi, Dáfila, Jaba, Humberto, Adriano, Alexandre T. e demais colegas pelo apoio, colaboração, convivência, companheirismo e descontração no ambiente de trabalho.

Aos amigos da pós-graduação e em especial a Marceli, Juliana, Domingos, Renata, Fábio, Sinval, Silvias, Rogério, Cristiane, Everton, Micheli, Lucimara, Gustavo, Ciro, Ricardo e Mário por todos os momentos que passamos juntos, por compartilharmos os momentos de aflição, pelo palavra de conforto, as visitas inesperadas no laboratório, enfim, por toda a amizade oferecida.

Agradecimento especial, aos amigos da ACEM, amigos de todos os

momentos, companheiros de festa, do vôlei, buraco, viagens e passeios, resumindo, amigos para toda hora. Muito obrigada Kazuko, Walter, Kaori, Shindi, Midori, Yoshi, Marina, Yukio, Marta, Carlos, Shizuko, Akemi, Ossamu, Érica, Haruo, Joelma, Shin, Kazuyoshi, Massayoshi, Toshio, Takeshi, Hiroyasu, Yukie e a todos outros que o nome não citei.

Ao meu namorado Gilberto Takeo Yano, por estar presente em todos os momentos nestes últimos oito anos, pois seu apoio sempre me deu forças para lutar e seguir em busca dos meus sonhos.

A minha família por todo o apoio oferecido. Em especial a Grace, Edson, Milton, tio Luis, tia Mika e ao meu irmão Marcos. E também aos pais do Takeo, Milton e Massako Yano, por me acolherem todos os finais de semana, pelo carinho e cuidado oferecido.

E principalmente, aos meus pais, Sakuzo e Márcia Mariko Cavaguchi, que, sem medir esforços, estão lutando fora do país, para me proporcionar todas as oportunidades para que eu chegasse até aqui, aos quais devo tudo o que sou.

CAVAGUCHI, S.A. **Seleção e caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. submetidos ao contato com o Fungicida Azoxistrobina.** 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a sensibilidade dos isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. ao fungicida azoxistrobina e promover a indução de resistência dos isolados. Para isso, foram realizados dois experimentos. O primeiro estudou a sensibilidade dos isolados do fungo ao fungicida azoxistrobina (Amistar 500 WG) e verificou-se a correlação entre o perfil molecular e o nível de sensibilidade dos patógenos ao fungicida por meio da técnica de RAPD. No segundo, selecionaram-se quatro isolados sensíveis e dois tolerantes, promovendo a indução de resistência ao fungicida. Após o término da indução, comparou-se, por RAPD, o perfil das colônias que sofreram indução com as colônias não induzidas. Para todos os estudos, utilizou a dose de 5 gL⁻¹ do produto comercial que inibiu 20% da germinação do isolado padrão CG 432. Para o estudo da sensibilidade realizou-se teste de germinação de conídios para 33 isolados monospóricos. Após seleção, separaram-se dois grupos, um sensível e outro tolerante ao fungicida. Selecionaram-se oito isolados sensíveis, com inibição da germinação superior a 30% (CG 481, CG 21, CG 138, UNIOESTE 40, CB 84, CG 460, CB 17 e CB 39) e sete isolados resistentes (CB 102, UNIOESTE 4, UEL 55, CG 458, CB 35, CB 87 e UEL 101) com inibição da germinação entre 3 e 10,54%. Estes dois grupos de isolados foram submetidos à caracterização molecular por RAPD. Não foi possível observar correlação entre a sensibilidade ao fungicida e o perfil molecular. No segundo estudo, de indução da resistência, realizaram-se dez repicagens das colônias de diferentes isolados com e sem contato com o fungicida. Foram escolhidos quatro isolados sensíveis (CG 460, CB 17, CB 39 e CB 84) e dois isolados tolerantes UNIOESTE 4 e CB 102. Avaliaram-se as variáveis: crescimento vegetativo, produtividade de conídios, viabilidade, virulência e a concentração mínima inibitória (CMI), além de se avaliar por RAPD possíveis alterações genéticas após indução. Os dois isolados tolerantes mantiveram as características avaliadas após indução de resistência. Para os sensíveis, observou-se que CG 460 e CB 17 apresentaram aumento no crescimento vegetativo e na produtividade de conídios na colônia induzida em relação à não induzida. Todos os isolados apresentaram aumento da viabilidade de conídios produzidos no decorrer das repicagens. Com exceção do isolado CB 84, os demais isolados não apresentaram diferença na virulência a insetos quando comparadas com colônias sem indução. A análise molecular por RAPD do isolado CB 17, mostrou mínima alteração de bandas após indução

Palavras-chave: Sensibilidade. Indução resistência. RAPD. Controle biológico conservativo.

CAVAGUCHI, S.A. **Selection and molecular characterization strain of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. submitted with the contact Azoxystrobin Fungicide.** 2008. 93p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to study the sensibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill strains to the fungicide azoxystrobin and promote the strains resistance induction. For that were conducted two experiments. The first test studied the sensibility of the strain of the fungus to azoxystrobin fungicide (Amístar 500 WG), and find out the correlation between the molecular profile and the level of sensibility of the pathogens to fungicide through the RAPD technique. In the second test, four sensitive strains and two tolerant strains were selected , promoting the resistance induction to the fungicide. After the end of induction, the profile of the colonies were compared by RAPD up who suffered induction to the colonies not induced by RAPD. For all studies, the dose of 5 g L⁻¹ of the commercial product was used that inhibited 20% of the germination of the standard strain CG 432. For the sensibility study a test of conidia germination was made for 33 monosporics strains. After selection, two groups was separated a sensitive one and a tolerant to the fungicide. Eight sensitive strains with inhibition of germination superior to 30% were selected (GC 481, CG 21, CG 138, UNIOESTE 40, CB 84, CG 460, CB 17 and CB 39) and seven tolerant strains (CB 102, UNIOESTE 4, UEL 55, CG 458, CB 35, CB 87 in UEL 101) with inhibition of germination between 3 and 10.54%. These two groups of strain were submitted to the molecular characterization by RAPD. It was not possible to observe the correlation between sensitivity to fungicide and molecular profile. In the second study, induction of resistance, ten subcultures of colonies of different strains with and without contact with the fungicide were made. Four sensitive strains were chose (CG 460, CB 17, CB 39 and CB 84), and two tolerant strains UNIOESTE 4 and CB 102. The variables evaluated were: growth, conidia productivity, viability, virulence and the minimum inhibitory concentration (MIC), in addition to evaluate by RAPD possible genetic changes after induction. The two tolerant strains maintained the characteristics evaluated after resistance induction. For sensitive ones, it was observed that CG 460 and CB 17 showed an increase in the growth and conidia productivity in the induced colony in relation to the not induced. All strains showed increased in conidia viability produced in the successive subcultures. With the exception of CB 84 strain, the other strains show difference in virulence when compared with colonies without induction. The molecular analysis of the strain CB 17, by RAPD, showed bands changes after induction, characteristic that can also be observed by the MIC, in which induced colony presented conidia productivity superior to the colony not induced, even at the highest dose of the product.

Keywords: Sensitivity. Resistance induction. RAPD. Conservative biological control.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO CONSERVATIVO	11
2.2 EFEITO DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	13
2.3 FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>Beauveria bassiana</i>	16
2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>B. bassiana</i>	17
2.5 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS	20
REFERÊNCIAS	24
3 ARTIGO A – SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) VUILL AO FUNGICIDA AZOXISTROBINA	32
3.1 RESUMO E ABSTRACT.....	32
3.2 INTRODUÇÃO	34
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
4 ARTIGO B – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> AO FUNGICIDA AZOXISTROBINA	52
4.1 RESUMO E ABSTRACT.....	52
4.2 INTRODUÇÃO	54
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.5 CONCLUSÕES.	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente tem ressaltado a importância das pesquisas científicas que procuram diminuir a agressão que o ecossistema sofre pelo uso excessivo de agrotóxicos. Em busca de uma agricultura sustentável, o controle biológico é um componente que assume importante papel dentro do programa de manejo integrado de pragas (ALVES, 1998).

No manejo integrado de pragas utilizam-se diversas táticas que visam o aproveitamento do potencial do controle natural das pragas, evitando o crescimento de populações daninhas a níveis que causem danos econômicos (SANTOS et al., 2006). Dessa maneira, a utilização do controle biológico associado a práticas culturais adequadas, forma a base do manejo integrado, que pode ser complementada com a utilização de inseticidas químicos ou de outras formas de controle de pragas (PEREIRA et al., 1998).

As pesquisas utilizando o controle microbiano, cresceram a partir dos anos 80, dada a maior preocupação em relação aos agrotóxicos utilizados em larga escala, pelos problemas de contaminação causados ao homem e animais (ALMEIDA; FILHO, 2006). No uso do controle microbiano, são empregadas várias estratégias de aplicação. Geralmente é feita a introdução inundativa, com aplicação de grande quantidade de inóculo, visando um efeito imediato sobre as pragas e, principalmente, a conservação ou proteção do ambiente (PEREIRA et al., 1998).

Para que o uso do controle microbiano seja eficiente, é necessária, entre outros aspectos, a utilização de produtos químicos mais seletivos e que não afetem os agentes entomopatogênicos. Desta maneira, são realizados trabalhos que avaliam o efeito dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos em condições controladas e a campo, além da seleção de isolados, aumentando assim, as chances de sucesso do controle da população do inseto alvo.

Estudos, principalmente *in vitro*, sobre o efeito de produtos fitossanitários, em especial os fungicidas, por sua natureza, são comuns na literatura. No entanto, poucos estudos foram realizados visando observar o comportamento de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em relação aos produtos fitossanitários e selecionar os menos sensíveis. A caracterização molecular destes isolados resistentes e sensíveis e sua analogias,

não foram ainda estudadas, assim como a forma de pressão de seleção por um produto fitossanitário pode alterar o comportamento do isolados com relação a diferentes variáveis. Assim, este estudo tem como objetivo selecionar e caracterizar molecularmente isolados de *B. bassiana*, submetidos à pressão de seleção pelo fungicida azoxistrobina.

1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTROLE BIOLÓGICO CONSERVATIVO

O controle conservativo é um método de controle biológico viável e de fácil utilização, pois visa preservar os agentes de controle que já existem naturalmente. Consiste em manipular o ambiente, para aumentar a sobrevivência, fecundidade, longevidade e a eficiência dos inimigos naturais, e desta maneira, contribuir para a redução populacional das pragas (PFIFFNER; WYSS, 2004; VENZON, 2006).

Ambientes adequados para inimigos naturais podem ser fornecidos por meio da diversificação da vegetação e da mudança na estrutura do habitat nas áreas de cultivo. Condições favoráveis dentro do agroecossistema devem ser mantidas ou incrementadas para ativar a atividade de inimigos naturais, como os entomopatógenos (FUXA, 1998).

Pfiffener e Wyss (2004) sugerem que pelo menos 10% da área cultivada devem ser reservadas para “áreas de compensação ecológica”, que incluem habitats não-agrícolas, como cercas-vivas, fragmentos florestais e faixas de plantas silvestres. Essas plantas, preferencialmente floríferas, podem ser cultivadas com culturas anuais ou perenes, com o objetivo de aumentar o controle biológico de artrópodes-praga fornecendo vários recursos ambientais para os inimigos naturais, como alimentação, modificação do microclima, refúgio após práticas agrícolas e locais de hibernação.

O cultivo de plantas com intenso florescimento e gramíneas perenes nas proximidades das culturas agrícolas, fornecem pólen e néctar para os inimigos naturais, atraindo-os para a cultura principal, o que incrementa o controle biológico de insetos-praga no agroecossistema (LONG et al., 1998; REBEK, et al., 2005). Para culturas perenes, a manutenção e o aumento da camada de folhas mortas que cobre o solo também fornece abrigo para os inimigos naturais durante a entressafra ou quando as condições ambientais são adversas (LONG et al., 1998).

Para o controle microbiano conservativo, a manipulação ambiental é feita de modo que as práticas agrícolas habituais ou alterações nas práticas de

manejo possam reforçar a atividade microbiana e reduzir a população da praga a níveis abaixo do dano econômico (FUXA, 1998). De um modo geral, os mecanismos para melhorar a eficiência do entomopatógeno, objetivam facilitar o contato do agente com o inseto praga, que geralmente é feito a partir do solo para um local como uma superfície foliar (ANDREADIS, 1987), e também promover a persistência e o crescimento populacional do entomopatógeno (BENZ, 1987).

Por exemplo, muitos afídios não-pragas que se alimentam de plantas daninhas e que vivem na periferia das culturas, servem de reservatório para multiplicação e dispersão de inóculo de fungos entomopatogênicos para afídios pragas (KELLER; SUTER, 1980). Também, observou-se o aumento proporcional de *Plathyrena scabra* (F.), infectados pelo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (FARLOW) Samson em lotes de soja com corredores de mata não-cultivada, quando comparada com lote sem corredores (KEMP; BARRETT, 1989).

O desenvolvimento de *Beauveria bassiana* é afetado em solos com semeadura convencional. A prevalência do fungo foi significativamente alta na lagarta *Ostrinia nubilalis* (Hübner) infestando em solo de milho com semeadura direta, do que na convencional (BING; LEWIS, 1992). Similarmente observou-se que, populações de *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* spp. foram maiores em cultivos de semeadura direta (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1994).

Muitos fatores influenciam a eficiência dos fungos entomopatogênicos como a radiação solar, a umidade e a ação de produtos não seletivos. Assim, em cada agroecossistema é necessário adotar medidas específicas que contribuam para diminuir os efeitos deletérios de alguns fatores abióticos e bióticos ou aumentar estes fatores quando incrementam a sobrevivência da população dos entomopatógenos. Por exemplo, a irrigação aumentou a atividade do fungo sobre o afídeo, *Therioaphis maculata* (Buckton) em alfafa (HALL; DUNN, 1957) e a irrigação induziu a epizootia de *Entomophora* sp. em populações de afídeos (HUANG et al., 1992).

2.2 AÇÕES DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

No controle biológico conservativo a seletividade dos agrotóxicos ou produtos fitossanitários sobre os fungos entomopatogênicos, é uma importante ferramenta que deve ser incrementada e estudada, por ser muitas vezes de fácil utilização e sem custos adicionais para o produtor. A avaliação da seletividade dos agrotóxicos é importante para orientar os agricultores na utilização de produtos mais adequados para condução de um controle sustentável das pragas (ALVES, 1998).

A maioria dos estudos neste sentido utilizam testes *in vitro*, em que se avaliam variáveis como germinação de conídios, crescimento vegetativo e produtividade de conídios. Por meio destes testes é possível avaliar o nível de toxicidade que o produto apresenta sobre o patógeno.

Em testes *in vitro*, ocorre uma exposição máxima do produto ao patógeno, o que não ocorre em condições de campo. Assim, quando esses produtos são compatíveis *in vitro*, há forte tendência de sua seletividade em condições de campo. Contudo, níveis elevados de toxicidade *in vitro*, não podem ser considerados bons indicadores para o comportamento do produto em condições de campo, embora mostre uma possibilidade de que isto possa ocorrer (BATISTA FILHO et al., 2001; NEVES et al., 2001;).

Das variáveis avaliadas, a germinação dos conídios tem sido considerada a mais importante nos testes de compatibilidade. Isto ocorre pela característica dos fungos entomopatogênicos infectarem os insetos por meio da germinação dos conídios, seja por ingestão, ou por contato. A preservação dos fungos em campo (inóculo) também ocorre, na forma de conídio. Desta maneira, se ocorrer uma inibição da germinação, a eficiência de controle pelo patógeno será comprometida se este tiver sido aplicado de forma inundativa, junto ou separadamente com o produto químico ou se presente naturalmente na lavoura (NEVES et al., 2001).

A esporulação/conidiogênese é considerada mais influente que o crescimento vegetativo de fungos entomopatogênicos. Isto ocorre pelo fato de os conídios serem estruturas que se disseminam no ambiente e também por serem

responsáveis pelo início da infecção no campo. Desta maneira, em uma colônia que apresenta um pequeno crescimento, porém que produz grande quantidade de propágulos, a disseminação da doença tende a ser maior, quando comparada a uma colônia que cresceu bem, no entanto teve pouca esporulação (ALVES et al., 1998).

O efeito dos produtos fitossanitários sobre os fungos entomopatogênicos pode variar em função da espécie e linhagem ou isolado do patógeno, da natureza química dos produtos e das dosagens utilizadas (ALVES et al., 1998).

Muitos fatores podem estar envolvidos no nível de toxicidade dos produtos fitossanitários aos fungos entomopatogênicos, como o modo de ação do ingrediente ativo, os sítios secundários de ação, concentração, componentes da formulação, modos de contato e sua capacidade de alterar o pH do meio de cultura (TAMAI et al., 2002).

Com relação aos estudos de efeito dos produtos fitossanitários sobre fungos entomopatogênicos, várias pesquisas foram realizadas, entretanto, sem muita padronização de metodologias tanto a campo como *in vitro*. Trabalhos contendo informações sobre o efeito de fungicidas a fungos entomopatogênicos, ainda tem uma abordagem restrita, quando comparadas aos estudos de inseticidas ou herbicidas.

Os efeitos fungitóxicos dos produtos óxido de fembutatina, quinometionato, fenpropatina, propargite e dicofol foram avaliados por Alves et al. (1993) sobre o crescimento vegetativo e esporulação dos fungos entomopatogênicos *Atractium flammeum* (Berke e Ravenel), *Hirsutella thompsonii* (Fisher), *Verticillium lecanii* (Zim) Viegas e *Arschersonia aleyrodii* (Webber). Os produtos menos compatíveis com os patógenos foram propargite e dicofol, as quais prejudicaram o crescimento vegetativo e a esporulação dos mesmos em meio de cultura.

A permanência do fungo entomopatogênico *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Batko, no campo, foi avaliada durante três anos consecutivos, quando aplicados fungicidas comerciais para controlar doenças da cultura do algodão, observando-se também a infectividade do fungo ao pulgão, *Aphis gossypii* (Glover). De uma maneira geral, os fungicidas utilizados reduziram as epizootias do patógeno, aumentando com isso, o nível populacional da praga nas áreas tratadas (SMITH; HARDEE, 1996).

Para estudar o efeito de fungicidas na cultura da batata, utilizados para o controle do fungo *Phytophthora infestans* (Mont), sobre a dinâmica populacional da população do pulgão, *Myzus persicae* (Sultzer) e a ocorrência dos fungos entomopatogênicos *Pandora neoaphidis* (Remaudière e Hennebert), *Entomophthora planchoniana* (Cornu) e *Conidiobolus obscurus* (Hall e Dunn) em condições de campo e laboratório, avaliou-se a germinação dos conídios e o crescimento vegetativo. A incidência de insetos atacados pelos fungos foi de 2,3% no tratamento com benomil, 12,7% com hidróxido de cobre e 32,4% na testemunha. Em condições de laboratório, a germinação dos conídios dos três entomopatógenos foi reduzida significativamente, exceto no tratamento com clorotalonil. Hidróxido de cobre inibiu o crescimento de *C. obscurus* e *E. planchoniana*, mas teve pouco efeito sobre *P. neoaphidis*. Clorotalonil não foi prejudicial ao crescimento das colônias dos três patógenos testados (LAGNAOUI; RADCLIFFE, 1998).

Todorova et al. (1998) estudaram o efeito *in vitro* de seis fungicidas (clorotalonil, maneb, tiofanato-metil, mancozeb, metalaxil + mancozeb e zineb) e dois herbicidas (diquate e glufosinato-amônio) utilizados comercialmente na cultura da batata sobre o fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Os produtos testados foram utilizados na concentração comercial recomendada em campo (x), na concentração dez vezes mais baixa (0,1x) e em uma concentração dez vezes mais elevada (10x), avaliando-se o crescimento vegetativo e esporulação. De maneira geral, todos os fungicidas causaram inibição do crescimento vegetativo (>80%). No segundo parâmetro avaliado, todos os químicos testados, exceto zineb (0,1x), reduziram a esporulação de *B. bassiana* 14 dias após o tratamento.

Embora muitos agentes químicos possam interferir negativamente na ação dos entomopatógenos, alguns produtos podem ser utilizados em associação com agentes microbianos de controle, por terem ação sinérgica ou aditiva com os mesmos. (PEREIRA et al., 1998). *B. bassiana* e *M. anisopliae*, quando associados com concentrações sub-letais de imidaclopride, promoveram efeitos sinérgicos sobre *Diaprepes abbreviatus* (L.) com mortalidade larval de 90 a 100% (QUINTELA; McCOY, 1997).

A grande variabilidade genética desses microrganismos pode ser considerada uma das principais vantagens no controle de pragas, onde cerca de 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos, os fungos (ALVES, 1998).

2.3 O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria Bassiana*

Entre os entomopatógenos, os fungos são os organismos mais estudados e apresentam grande potencial para o controle de pragas. Estes microrganismos têm ocorrido em condições naturais, tanto na forma enzoótica como epizoótica, contribuindo para a redução das populações de pragas no agroecossistema (FERRON, 1978).

O gênero *Beauveria* foi descrito em 1911 por Beauverie e em 1912 por Vuilemin (MACLEOD, 1954). Bing e Lewis (1992) relataram a *B. bassiana* como um entomopatógeno presente no solo e também endofítico, colonizando tecidos de plantas.

Dentre suas características, apresenta micélio branco ou levemente amarelado, hifas hialinas, e septadas, e conidióforos únicos, irregularmente agrupados ou em cachos verticulados (MACLEOD, 1954). Reproduz-se de forma vegetativa, via conídios e segmentos hifais. Quando cultivado em meio sólido, os conídios de *B. bassiana* são globosos. Em meio líquido aerado ou na hemolinfa dos insetos, os conídios assumem formas elipsoidais, semelhantes a estruturas leveduriformes que são conhecidas como blastósporos (FERRON, 1978).

Fatores como pH do meio, umidade relativa entre 75 e 100% sobre diferentes hospedeiros (SOSA-GOMEZ; ALVES, 2000) e luminosidade, podem também interferir na germinação de conídios e na sua sobrevivência. A temperatura ótima para o crescimento desta espécie está entre 20° e 26°C (FERRON, 1981) ou 20° a 30°C (FARGUES et al., 1992), apesar de poder suportar temperaturas de até 45° graus (Alves, 1998).

O diferencial desta espécie em relação aos demais agentes entomopatogênicos, como vírus e bactérias, é o fato de não necessitar ser ingerido pelos seus hospedeiros para ser infectivo. Dessa forma, estes microrganismos são capazes de penetrar no corpo do inseto nas regiões membranosas e intersegmentais, podendo também penetrar diretamente pela cutícula, órgãos sensoriais e traquéias (SOSA-GÓMEZ et al., 1997).

O sucesso de alguns programas de controle biológico, com a utilização de *B. bassiana*, é dado pela sua distribuição e intensidade de ocorrência (MELO; AZEVEDO, 2000). Além disso, suas necessidades nutricionais são simples,

pois necessita apenas fonte de carbono para a germinação e fonte de nitrogênio para o crescimento micelial, o que possibilita o emprego desta espécie em experimentos laboratoriais e a campo, uma vez que, ela pode crescer facilmente nos mais variados ambientes, naturais ou artificiais (KUCERA, 1971).

Por infectar uma ampla classe e ser comum na natureza, este fungo é utilizado em todo o mundo, isoladamente ou associado a outros fungos, como inseticida microbiano no controle de pragas da agricultura (CASTRILLO et al., 2003).

2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Beauveria bassiana*

Antes do advento da tecnologia molecular, a classificação de fungos entomopatogênicos baseava-se apenas em características bioquímicas e morfológicas. Estas características incluíam a reprodução, morfologia do conídio e da colônia, enzimas hidrolíticas, isoenzimas, entre outras. Estes métodos tiveram êxito determinando os espectros de espécies dentro do gênero, no entanto, estes mesmos estudos revelaram um alto grau de variação entre isolados obtidos de diferentes localidades e hospedeiros (DESTÉFANO et al., 2004).

Métodos de biologia molecular, baseados nos estudos do DNA, oferecem a possibilidade de distinção de linhagens estritamente relacionadas. Técnicas moleculares como PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphis) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) são aplicadas na avaliação do polimorfismo das diferentes espécies de fungos, constituindo-se em poderosas ferramentas para o diagnóstico ou identificação precisa destes microrganismos nos vários níveis taxonômicos (FUNGARO et al., 1996; PANTOU et al., 2003).

Uma das variações da PCR, o RAPD, foi descrita por Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para caracterização molecular de espécies de plantas, bactérias e fungos, incluindo os entomopatogênicos (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1996). É também uma excelente ferramenta para identificação de espécies ou isolados e estimativa da variabilidade genética entre isolados e construção de dendogramas (OBORNIK et al., 2000).

A análise de RAPD tem sido utilizada para separar os isolados de fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana* (CASTRILLO; BROOKS, 1998). Esta técnica tem alto potencial em explorar e verificar a variabilidade genética de isolados de diferentes localidades e hospedeiros (FUNGARO et al., 1996). Em alguns casos, podem ser correlacionadas com a patogenicidade, a distribuição geográfica e a preferência ao hospedeiro (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1993). Por meio destes estudos, observa-se alto grau de variabilidade dentro de espécies identificadas morfológicamente e entre isolados provenientes da mesma área geográfica (BIDOCHKA et al., 1994).

A caracterização por RAPD pode ser útil, ainda, quando novos isolados são introduzidos dentro de um ecossistema para o controle biológico de determinada praga. Isso assegura a detecção do patógeno introduzido contra o nativo, para se saber qual está, efetivamente, controlando a praga (DEVI et al., 2001). Além disso, a técnica pode ser introduzida como controle de rotina para verificar a estabilidade genética do fungo em produção massal (BERRETTA et al., 1998).

Segundo Boucias et al. (1982) a ampla variabilidade natural possibilita um aumento da capacidade adaptativa das linhagens às flutuações bióticas e abióticas do ambiente. Provavelmente, este polimorfismo genético permite à *B. bassiana* parasitar uma ampla gama de insetos e até ter níveis diferenciados de sensibilidade a produtos químicos como os fungicidas.

A variabilidade genética de *B. bassiana* foi constatada por diferentes autores, utilizando diferentes técnicas. Como foi observado por Paccola-Meirelles e Azevedo (1990) ao estudar a variabilidade natural de *B. bassiana*, quanto a produção de conídios em diferentes meios de culturas, sensibilidade ao benomil, produção de isoenzimas e perfis eletroforéticos para esterases, concluíram que esta espécie apresenta grande variabilidade para todos os parâmetros avaliados.

Estudando o perfil eletroforético para isoenzimas de 146 isolados do gênero *Beauveria*, foram observadas 47 classes genotípicas diferentes, sugerindo que o potencial da variabilidade genética pode ser expressa em populações naturais (St. LEGER et al., 1992). Em estudo posterior, Neuvéglise et al. (1994), também detectaram polimorfismos isoenzimáticos em *Beauveria*, enquanto que, por meio da técnica de RFLP de dois genes isoenzimáticos, os autores conseguiram separar as linhagens estudadas em sete grupos distintos.

Outros autores, estudando perfis para esterases observaram alguma homogeneidade entre isolados de hospedeiros relacionados e de mesma área geográfica (St. LEGER et al., 1992). Tal fato pode ser resultado de uma forte pressão de seleção por parte do inseto hospedeiro ou do ambiente, sugerindo a existência de uma estreita correlação entre o tipo de hospedeiro, a distribuição geográfica e o perfil eletroforético do entomopatógeno.

Mais recentemente outras metodologias de estudo da variabilidade genética vêm sendo utilizadas nas pesquisas com *Beauveria*. Urtiz e Rice (1997) analisaram a variabilidade genética entre isolados de *B. bassiana* que atacam o coleoptero *Lissorhoptrus oryzophilus* (Kuschel), coletados em diferentes regiões, juntamente com isolados coletados no solo, de outros insetos hospedeiros e outras espécies de fungos. Através da técnica de RAPD-PCR, foram obtidas 17 bandas utilizando 10 *primers*. A observação dos padrões de bandas obtidos revelou dois grupos entre os isolados de *B. bassiana*. Um grupo constitui-se de 13 isolados com similaridade de 95%, enquanto que o outro constitui-se de 6 isolados com similaridade de 91%. Os isolados obtidos de um mesmo hospedeiro, em uma mesma época e região encontraram-se em grupos diferentes. Assim, concluíram que um mesmo grupo pode habitar locais diferentes em uma mesma época, e sugerem que ocorra pouca ou nenhuma recombinação genética entre os diferentes genótipos.

Ainda utilizando a técnica de RAPD, Maurer (1997) analisou 38 linhagens de *B. bassiana*, isoladas de diversos hospedeiros e diferentes regiões geográficas. Foram utilizados quatro *primers* que geraram 65 produtos de amplificação, permitindo observar que isolados obtidos a partir de uma mesma família de hospedeiros dividiam-se em dois grupos. Um grupo consistia de todas as linhagens isoladas do gênero *Ostrinia*, independente da origem e o outro grupo constitui-se principalmente de linhagens isoladas do gênero *Diatraea*. Da mesma forma, isolados obtidos do gênero *Sitona*, formaram um sub-grupo distinto das demais linhagens isoladas da família Curculionidae. Segundo estes autores, os resultados mostraram que o inseto hospedeiro parece ser o fator mais importante na estrutura da população deste entomopatógeno.

Na comparação de *Beauveria* spp procedentes da Nova Zelândia com isolados de outros países, Glare e Inwood (1998) utilizaram métodos morfológicos e moleculares. A análise de 330 locos de RAPD, obtidos com 10 *primers* permitiu a divisão dos isolados em 4 grupos. Um grupo heterogêneo

contendo *B. bassiana* e *B. brongniartii* (Saccardo) procedentes tanto da Nova Zelândia como de outros países, um segundo grupo constituído apenas por *B. bassiana* da Nova Zelândia, um terceiro grupo contendo apenas isolados de *B. brongniartii* procedentes tanto da Nova Zelândia como de outro lugares e um quarto grupo contendo outras espécies de *Beauveria*.

Wang et al. (2005) utilizaram marcadores ISSR (inter-single sequence repeats) para análise da variabilidade genética de 39 isolados de *Beauveria* spp. provenientes de distintos hospedeiros e de diferentes áreas geográficas. Por meio dessa técnica foi possível distinguir quatro espécies de *Beauveria*, como a *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* e *Beauveria amorpha* (Hohn). Fernandes et al. (2006) utilizaram também em espécies de *Beauveria*, a técnica de RAPD juntamente com análise morfológica para caracterizar 50 isolados provenientes do carrapato *Boophilus microplus*, detectando 23 perfis eletroforéticos.

2.5 RESISTÊNCIA DE FUNGOS A FUNGICIDAS

A maioria dos estudos de resistência de fungos a fungicidas no meio agrícola é observada em fungos fitopagênicos, pela sua importância na sanidade das lavouras. O uso de fungicidas é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, sendo a única forma de controle para diversos problemas fitossanitários. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas. No entanto, o uso sucessivo do mesmo ingrediente ativo, pode promover a seleção de fungos resistentes com menor sensibilidade ao produto ou induzir mutações, colocando em risco a eficiência do método (GHINI, 2007).

Com relação ao aparecimento da resistência de fitopatógenos aos fungicidas, em geral as alterações genéticas que resultam na resistência ocorrem com maior facilidade com compostos que atuam primariamente em um ou poucos passos do metabolismo da célula do fungo do que com produtos que interferem em muitos passos do processo metabólico (GHINI; KIMATI, 2000).

A resistência a fungicidas pode ser avaliada de diversas formas, dependendo da combinação, patógeno-hospedeiro-fungicida. Os princípios gerais

são os mesmo para os diferentes organismos. O reconhecimento de linhagens resistentes de fungos é feito por meio da comparação dos dados de linhagens sensíveis, por testes de sensibilidade de patógenos, denominados “base-line”, são realizados para obter dados da variabilidade inicial do patógeno quanto à sensibilidade ao fungicida. Essas informações servem como referência para uma futura avaliação da ocorrência de resistência (AZEVEDO; OLIVEIRA, 2003).

Um estudo de “base-line” foi publicado por Olaya e Köller (1999), para o fungicida kresoxim-methyl, com populações de *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. em pomares comerciais de macieiras dos Estados Unidos. Estas populações apresentaram uniformidade quanto à sensibilidade ao produto. No entanto, em testes *in vitro*, os métodos de monitoramento foram comparados com a germinação de conídios, no qual os resultados apresentaram diferença. Assim sendo, os testes *in vitro* são mais indicados para o monitoramento, apesar de serem mais trabalhoso, são mais fáceis de serem padronizados e apresentarem menor variação dos resultados.

As técnicas utilizadas para avaliar a resistência a fungicidas variam muito. Podem ser simples e rápidas como o cultivo de esporos em meio de cultura, a germinação de esporos em ágar (testes *in vitro*) ou mais sofisticados como a utilização de rastreamento de mutação utilizando um sistema de diagnóstico moderno baseado em técnicas moleculares, como PCR. As mutações nas linhagens resistentes podem ser pesquisadas em populações de campo e detectadas em freqüências muito menores que aquelas facilmente atingidas em bioensaios. Assim, baseado no conjunto de análise de dados, o bioensaio é a base para o monitoramento da resistência (RAPOSO, et al., 1994).

A vantagem do teste *in vitro* é que mede a resistência, independente dos mecanismos que com ela estejam relacionados. São facilmente adaptáveis e podem ser aplicados à maior parte dos sistemas, desde que a resposta medida seja relevante para a ação do fungicida. As principais desvantagens destes testes, referem-se ao elevado consumo de recursos e o fato de não identificarem o genótipo (alelo) que provoca a resistência. Mas quando os mecanismos são conhecidos, os métodos bioquímicos e os de biologia molecular, superam as desvantagens dos testes *in vitro*. Por meio das técnicas de PCR ou RAPD, podem se identificar as mutações de pontos relacionados à resistência (GREEN et al., 1990).

Após pressão de seleção do patógeno ao produto fitossanitário, é importante que seja feito um bioensaio com insetos-testes, para verificar os níveis de virulência após a seleção. Kosir et al. (1991) analisaram por meio de RFLP do DNA genômico duas linhagens de *B. bassiana*, uma mais virulenta (selvagem) e um mutante menos virulento. Este último apresentou um padrão de comprimento de fragmentos de restrição diferentes das linhagens mais virulentas. Tais resultados indicaram que as diferenças observadas entre as linhagens incluíram a perda de alguma seqüência de DNA; a qual deve estar envolvida na virulência. Cavalcanti et al. (2004) ao avaliarem em seu trabalho os níveis de desenvolvimento da *B. bassiana* após pressão de seleção, observaram que o fungo manteve-se eficiente no processo de germinação, crescimento vegetativo e esporulação, além de manter elevada porcentagem de mortalidade larval do inseto-teste (84%).

A grande diversidade das populações de fungos e sua intensa capacidade de multiplicação fornecem uma ampla oportunidade para seleção de linhagens resistentes. Assim, numa população sensível a um determinado produto, colônias com menor sensibilidade se propagam devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade encontrada nos seres vivos (GHINI; KIMATI, 2000). Da mesma maneira que ocorre a resistência dos fungos fitopatogênicos a fungicidas, também é possível selecionar isolados de fungos entomopatogênicos capazes de resistir à ação de produtos fitossanitários ou qualquer agente agressor existente no meio ambiente.

A realização de estudos genéticos ou mesmo de melhoramento de linhagens de fungos entomopatogênicos tem como passo inicial a obtenção de marcas genéticas, que podem ser mutações espontâneas ou induzidas por agentes químicos ou físicos (BELLO; PACCOLA-MEIRELLES, 1998). O uso de mutantes nos estudos genéticos com microrganismos é bastante amplo, por isso o isolamento e a caracterização de mutantes com resistência a fungicidas são valorizados na literatura. No entanto, são poucos os trabalhos realizados entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários.

Pombeiro e Martinez-Rossi (1990) identificaram em *Aspergillus nidulans* (Eidam), um mutante resistente aos fungicidas triadimefon e imazalil. O gene responsável por tal resistência foi mapeado no grupo de ligação VII. Em um outro experimento, Martinez-Rossi e Azevedo (1989) selecionaram neste mesmo fungo, três colônias mutantes resistentes ao fungicida benomil e observaram que

estes mutantes possuíam um nível de resistência muitas vezes superior a linhagem selvagem. Fraaije et al. (2002) promoveram seleção da resistência dos isolados de *Blumeria (Erysiphe) f.sp. tritici* para o fungicida azoxistrobina e desenvolveram um diagnóstico por meio da técnica de PCR, na qual identificou o alelo responsável pela característica de resistência.

Inglis et al. (1999) utilizaram técnicas de engenharia genética para obtenção de linhagens de *Paecilomyces* spp. resistentes ao fungicida benomil. Pekrul e Grula (1979) utilizando a luz ultravioleta, obtiveram 11 mutantes de *B. bassiana* com atividade proteolítica variável. Cheung e Grula, (1982) identificaram cinco linhagens mutantes de *B. bassiana*, as quais diferiam na virulência e na atividade proteolítica, indicando uma correlação entre os dois fatores.

Técnica mais simples, como a exposição do microrganismo de forma sucessiva a determinado agente mutagênico, também foram utilizadas, como no trabalho de Meirelles et al. (1997), que obtiveram linhagens de *M. anisopliae* resistentes à radiação ultravioleta, importante agente de degradação de estruturas fúngicas no meio ambiente. Cavalcanti et al. (2004) em seu estudo, selecionaram o isolado de *B. bassiana* UFLA-4 e após três repicagens em meio de cultura + produto fitossanitário, promoveram a resistência do isolado ao acaricida fenprotrina.

A virulência de fungos entomopatogênicos é uma característica de interesse para o melhorista, passível de ser alterada pela mutação induzida. Desta maneira, a obtenção de mutantes é uma importante ferramenta a ser utilizada nos mais variados estudos genéticos e de melhoramento de linhagens entomopatogênicas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.E.M.; FILHO, A.B. Microrganismos no controle de pragas. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D.T. **Controle biológico de pragas**. pg 35-44. 2006.

ALVES, S.B.; MOINO JÚNIOR, A.; VIEIRA, S.A. Ação tóxica de alguns defensivos agrícolas sobre fungos entomopatogênicos. **Ecosistema**. 18:161-170. 1993.

ALVES, S.B.; MONINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, cap 8, 217-218.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, FEALQ, p. 289-381, 1998.

ANDREADIS, T. G. Transmission. In: FUXA, J.R. & Y. Tanada (eds.), **Epizootiology of insect diseases**. Nueva York, pp. 159-176. 1987.

AZEVEDO, L.A.S.; OLIVEIRA, S.H.F. Utilização de fungicidas protetores no manejo da resistência de fungos. **Boletim Técnico 1**. 2003.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M ; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**. 30: 437-447. 2001.

BELLO VA; PACCOLA-MEIRELLES LD. Localization of auxotrophic and benomyl resistance markers through the parasexual cycle in the *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. entomopathogen. **Journal Invertebrate Pathology**. 72:119–125. 1998.

BENZ, G. Environment. In: **Epizootiology of Insect Diseases**. (J.R. Fuxa and Y. Tanada, eds),. New York, NY. pp. 177-214. 1987.

BERRETTA, M.F., LECUONA, R.E., ZANDOMENI, R.O.; GRAU, O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal Invertebrate Pathology**. 71: 145–150. 1998.

BIDOCHKA MJ; MCDONALD MA; ST. LEGER RJ; ROBERTS, DW. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetic**. 25:107–113.1994.

BING, L.A.;LEWIS, L.C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Biocontrol Science and Technology** 2:39-47. 1992.

BOUCIAS, D. G., SCHOBORG, E. A.;ALLEN, G. E. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatalis*. **Journal Invertebrate Pathology**. 39, 238– 240. 1982.

CASTRILLO, L.A.; BROOKS, W.M. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. **Journal of Invertebrate Patology**. 72: 190-196. 1998.

CASTRILLO, L. A; VANDENBERG, J.D.; WRAIGHT, S.P. Strain specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in fields by use of sequence characterized amplified region markers. **Journal Invertebrate Pathology**. 82, 75 – 83. 2003.

CAVALCANTI, S.C.; MOINO JR, A.; SOUZA, G.C.; DUARTE, A.M. Seleção de colônias de *Beauveria bassiana* resistentes a produtos fitossanitários. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**. 71: 21-27. 2004.

CHEUNG, P.Y.K., GRULA, E.A. *In vivo* events associated with entomopathology of *Beauveria bassiana* for the corn earworm (*Heliothis zea*). **Journal Invertebrate Pathology**. 39: 303–313. 1982.

DESTÉFANO, R.H.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; MESSIASI., C.L. Detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers. **Genetics and molecular biology**. 27(2): 245-252. 2004.

DEVI, K. U.; PADMAVATHI, J.; SHARMA, H. C.; SEETHARAMA, N. Laboratory evaluation of the virulence of *Beauveria bassiana* isolates to the sorghum shoot borer *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) and their characterization by RAPD-PCR. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 17(2): 131-137. 2004.

FARGUES, J., MANIANIA, N.K., DELMAS, J.C. ; SMITS, N. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycetes entomopathogènes. **Agronomie**. 12: 557-564. 1992.

FERNANDES, E.K.P ; COSTA, G.L. ; MORAES, A. M. L. ; ZAHNER, V.. ; BITTENCOURT, V.R.P . Study on morphology, pathogenicity and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**. 98. 324-332, 2006.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogeneous fungi. **Annual Review of Entomology**. 23: 409-442, 1978.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pest and plant diseases**. London: Academic, p. 465-482. 1981.

FRAAIJE, B.A.; BUTTERS, J.A.; COELHO, J.M.; JONES, D.R.; HOLLIMON, D.W. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific realtime PCR measurements with the fluorescent dye SYBR green I. **Plant Pathology**. 51, 45–54. 2002.

FUNGARO, M.H.P. Diversity among soil insect isolates of *Metarhizium anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**. 22: 389-392, 1996.

FUXA, J.R. Environmental manipulation for microbial control of insects. **Conservation Biological Control** (ed. By P. Barbosa),. Academic Press, San Diego, California. pp. 255–268. 1998.

GHINI, R. Resistência de fungos a fungicidas. Acessado: 25 outubro 2007.
Disponível
m:http://www.fesbe.org.br/v3/?page=informacoes/ler&tipo=informacao_a&id=15.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 78p. 2000.

GLARE TR, INWOOD AJ. Morphological characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. **Mycological Research**. 102: 250–256. 1998.

GREEN, M.B.; LEBARON, H.M.; MOBERG, W.K. Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. **ACS Symposium series 421**.. Washington: ACS. 496. 1990.

- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Construction of cloned DNA probes for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in grasshoppers. **Journal Invertebrate Pathology**. 62: 233-240. 1993.
- HALL, I.M.; DUNN, P.H. Fungi on spotted alfalfa aphid. Calif. Agric. 11, 5-14. Horton, D. L., Carner, G.R. and turnipseed, S.G. (1980). Pesticide inhibition of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in soybeans. **Environmental Entomology**. 9: 304-308. 1980.
- HEGEDUS DD; KHACHATOURIANS GG. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Journal Invertebrate Pathology**. 67:289–299. 1996.
- HUANG, Y.; ZEN, B.; LI, Z. Natural and induced epizootics of *Erynia ithacensis* in mushroom hothouse populations of yellow-legged fungus gnats. **Journal Invertebrate Pathology**. 60:254, 258. 1992.
- INGLIS, P.W.; MAGALHÃES, B.P.; VALADARES-INGLIS, M.C. Characterization of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* using telomeric fingerprinting. **Microbiology Letters**. 179: 49–52. 1999.
- KELLER, S.; SUTER, H. Epizootiologische Untersuchungen über das Entomophthora-Auftreten bei feldaulich wichtigen Blattlausarten. **Acta Oecologica, Oecologica Applicata**, 1, 63–81. 1980.
- KEMP, K.C.; BARRETT, G.W. Spatial patterning: impact of uncultivated corridors on arthropod populations within soybean agroecosystems. **Ecology**, 70, 114–128. 1989.
- KOSIR JM; MACPHERSON JM; KHACHATOURIANS GG. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal Microbiology**. 37:534–541. 1991.
- KUCERA, M. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, 17: 211-215. 1971.
- LAGNAOUI, A.; RADCLIFFE, E.B.; Potato fungicides interfere with entomopathogenic fungi impacting population dynamics of green peach aphid. **American Journal of Potato Research**, Maine, 75: 19-25. 1998.

LONG, R.F.; CORBETT, A.; LAMB, C.; REBERGHORTON, C.; CHANDLER, J.; STIMMANN, M. Beneficial insects move from flowering plants to nearby crops. **California Agriculture**, 53,(5): 23-26. 1998.

MACLEOD D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal Botanic**. 32:818–890. 1954.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; AZEVEDO, J.L. Characterization of benomyl resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. **Revista Brasileira de Genética**. 12(3): 477-484. 1989.

MAURER P.; COUTEAUDIER Y; GIRARD P.A.; BRIDGE P.D.; RIBA G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**. 101:159–164. 1997.

MEIRELLES, L.D.P.; BOAS, AM.V.; AZEVEDO, J.L. Obtention and evaluation of pathogenicity of ultra violet resistant mutants in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Revista de Microbiologia**. 28 (2): n121-124. 1997.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio ambiente-CNPMA, v. 2, 388p. 2000.

NEUVEGLISE C.; BRYGOO Y.; VERCAMBRE B.; RIBA G. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**. 98:322–328. 1994.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P.T.; MOINO JR, A.. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoids insecticides. **Neotropical Entomology**. 30: 263-268. 2001.

OBORNIK M., JIRKU M.; DOLEZEL D. Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic? **Canadian Journal Microbiology**. 47:813-819. 2001.

OLAYA, G.; KÖLLER, W. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to strobilurin fungicide kresoxim-methyl. **Plant disease**. 83(3): 274-278. 1999.

PACCOLA- MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**.(33): 657-672, 1990.

- PANTOU, M.P., MAVRIDOU, A. AND TYPAS, M.A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetic Biological**. 38, pp. 159–174. 2003.
- PEKRUL, S.; GRULA, E.A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. **Journal Invertebrate Pathology**. 34: 238-247. 1979.
- PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no Manejo Integrado de Pragas. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, FEALQ, p. 1097-1015, 1998.
- POMBEIRO, S.R.C.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Genetic study of a triadimefon-resistant mutant of *Aspergillus nidulans*. **Revista Brasileira de Genética**. 13(4): 653-660. 1990.
- PIFFNER, L.; WYSS, E. Use of wildflower strips to enhance natural enemies of agricultural pests. In: GURR, G.M.; WRATTEN, S.D; ALTIERI, M. (Eds.). **Ecological Engineering for Pest Management: Advances in Habitat Manipulation for Arthropods**. CSIRO Publishing, 256. 2004.
- QUINTELA, E.D.; MCCOY, C.W. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diarepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. **Journal of Economic Entomology**. Washington. 91(1): 110-122. 1998.
- RAPOSO, R.; COLGAN, R.; DELCAN, J.; MELGAREJO, P. Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Brotrytis cinerea*. **Plant disease**. 79 (3): 294-296. 1995.
- REBEK, E.J.; SADOFF, C.S.; HANKS, L.M. Manipulating the abundance of natural enemies in ornamental landscapes with floral resource plants. **Biological Control**, 33(2) 203-216. 2005.
- SANTOS, A.C.; BUENO, A.F.; FREITAS BUENO, R.C.O. Seletividade de defensivos agrícolas aos inimigos naturais. In: **Controle biológico de pragas**. PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D.T. 221-228. 2006.

SMITH, M.T.; HARDEE, D.D. Influence of fungicides on development of entomopathogenic fungus (Zygomycetes: Nezygitaceae) in the cotton aphid (Homoptera: Aphidae). **Environmental Entomology**. 25(3): 677- 687. 1996.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Effect of till and no-till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. **Florida Entomologist**. 77: 93-95. 1994.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F.; SANTOS, M. *Bemisia* spp. na cultura da soja: ocorrência, controle químico e incidência do fungo entomopatogênico *Paecilomyces* sp. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 16. 2 a 7/3/97. Salvador, BA. Resumos. Salvador. **Sociedade Entomológica do Brasil**. 144. 1997.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; S.B. ALVES. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 29: 515-521. 2000.

ST. LEGER RJ, ALLEE LL, MAY R, STAPLES RC, ROBERTS DW. World-wide distribution of genetic variation among isolates *Beauveria* spp. **Mycological Research**. 96: 1007–1015. 1992.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M.; PADULLA, L.F.L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivo Instituto Biológico**. 69 (3): 89-96.2002.

TODOROVA, S.I.; CODERRE, D.; DUCHESNE, R.M.; COTÉ, J.C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. **Environmental Entomology**. 27: 427-433. 1998.

URTZ, B.E.; RICE, W.C. RAPD-PCR characterization of the *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. **Letters in Applied Microbiology**, 25: 405-409. 1997.

VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; PALLINI, A. (Eds.). **Controle alternativo de doenças e pragas**. Viçosa: EPAMIG, p.1-22. 2005.

WANG, C; ST. LEGER, R. J. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukaryotic Cell**. 4(5): 937-947, 2005.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**. 18: 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18: 6531-6535. 1990

3 ARTIGO A – SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin AO FUNGICIDA AZOXISTROBINA

3.1 RESUMO

Produtos fitossanitários podem influenciar a ação de fungos entomopatogênicos em função da espécie ou isolado do patógeno, da natureza química dos produtos e das dosagens utilizadas. O fungo *Beauveria bassiana* apresenta polimorfismo genético, que permite parasitar uma ampla gama de insetos e até possuir níveis diferenciados de sensibilidade a produtos químicos, como os fungicidas. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a sensibilidade dos isolados de *B. bassiana* ao fungicida azoxistrobina e verificar se há correlação entre o perfil molecular e o nível de sensibilidade ao fungicida. Para o estudo da sensibilidade, foram utilizados 33 isolados monospóricos e a dose de 5g L⁻¹ do produto comercial, a qual inibiu 20% germinação do isolado padrão CG 432. Foram realizados testes de germinação de conídios para seleção dos isolados. A porcentagem de inibição de *B. bassiana* variou entre 3 e 81% aproximadamente. Foram selecionados oito isolados sensíveis, os quais apresentaram inibição superior a 30% (CG 481, CG 21, CG 138, UNIOESTE 40, CB 84, CG 460, CB 17 e CB 39) e sete isolados tolerantes (CB 102, UNIOESTE 4, UEL 55, CG 458, CB 35, CB 87 e UEL 101) com taxa de inibição de conídios que variou entre 3 e 10,54%. Os dois grupos selecionados foram submetidos a análise de RAPD, para verificar se houve correlação entre o perfil genético e a sensibilidade dos isolados a azoxistrobina. Em geral, não houve correlação entre a sensibilidade e o perfil molecular. Assim, a hipótese é a de que a similaridade entre os isolados esteja relacionada à origem, tipo de hospedeiro ou ao uso contínuo de produto químico em determinada região, que pode ter induzido a resistência dos isolados.

Palavras-chave: Controle microbiano conservativo. Compatibilidade. Seleção de isolados. Fungo entomopatogênico.

SENSITIVITY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLADOS OF *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin THE AZOXYSTROBIN FUNGICIDE

ABSTRACT

Pesticides may influence the action of entomopathogenic fungi depending of the pathogen species or strain, the chemical nature of the products and the dosages used. The fungus *Beauveria bassiana* have genetic polymorphism, which allows to parasite a wide range of insects and even show different sensibility levels to chemicals such as fungicides. Therefore, this study aimed to investigate the sensibility of *B. bassiana* strains to the fungicide azoxystrobin and verified if there is correlation between the molecular profile and the level of sensibility to this fungicide. For the sensibility study, 33 monospores strain were used in dose of 5 g L⁻¹ of the commercial product, which inhibited 20% germination of the standard strain CG 432. A conidial germination test germination was made for strains selection. The percentage of inhibition of *B. bassiana* germination ranged between 3 and 81%. Eight sensitive strains with inhibition of germination superior to 30% were selected (GC 481, CG 21, CG 138, UNIOESTE 40, CB 84, CG 460, CB 17 and CB 39) and seven tolerant strains (CB 102, UNIOESTE 4 , UEL 55, CG 458, CB 35, CB 87 in UEL 101) with inhibition of germination between 3 and 10.54%. The two selected groups were submitted to RAPD analysis to check if there are a correlation between the genetic profile and the sensibility of the strains to azoxystrobin. In general, there was no correlation between the sensibility and molecular profile. So the hypoteses is that the similarity between strains are related to the origin, host type or the continuous use of the chemical product in a specific area, which may induce the strain resistance.

Keywords: Conservative biological control. Compatibility. Strain selection. Entomopathogenic fungus.

3.2 INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin é conhecido por infectar um amplo número de espécies de insetos e ser comumente encontrado na natureza. Pode ser utilizado, isoladamente ou associado a outros fungos no controle de pragas da agricultura (CASTRILLO et al., 2003).

Entre os diferentes tipos de controle biológico, o controle conservativo visa preservar a eficiência do inimigo natural, no caso o fungo entomopatogênico, por meio da manipulação ambiental e da utilização de práticas agrícolas ou alterações no manejo da cultura, que possam reforçar a atividade microbiana e reduzir as populações de pragas a níveis abaixo do dano econômico (FUXA, 1998). Muitos fatores influenciam na persistência dos fungos entomopatogênicos no ambiente, como a radiação solar, a umidade e a ação de produtos fitossanitários não seletivos (CAVALCANTI et al., 2002)

O uso associado do controle químico com o biológico, tem sido cada vez mais utilizado nos programas de manejo integrado de pragas, levando à necessidade de se estudar o efeito de agrotóxicos sobre os entomopatógenos. Um dos grandes problemas dos programas de manejo de pragas, é a falta de seletividade destes produtos em relação aos agentes de controle biológico como predadores, parasitóides e entomopatógenos (SILVA; NEVES 2005). Para avaliar a seletividade são feitos estudos de compatibilidade, ferramenta indispensável ao manejo integrado de pragas, que contribui para a preservação destes patógenos e, conseqüentemente, manter o equilíbrio dentro do sistema agrícola (NORRIS et al. 2003). Das variáveis analisadas nos testes de compatibilidade, a germinação é considerada como o principal fator a ser avaliado (ANDERSON; ROBERTS, 1983; HIROSE et al. 2001; NEVES et al., 2001).

A sensibilidade do entomopatógeno pode variar em função da espécie ou isolado, da natureza química dos produtos, das dosagens utilizadas (Alves et al., 1998), do modo de ação do ingrediente ativo, dos sítios secundários de ação, dos componentes da formulação, do modo de contato e de sua capacidade em alterar o pH do meio de cultura (TAMAI et al., 2002).

Estudos utilizando a biologia molecular permitem avaliar a variabilidade genética ao nível de DNA por meio de técnicas como a de RAPD

(BIDOCHKA et al., 1994), que possibilita separar ou agrupar isolados de fungos entomopatogênicos, como a *B. bassiana* (CASTRILLO; BROOKS, 1998). Esta técnica tem um alto potencial para explorar, verificar e correlacionar a variabilidade genética dos fungos em relação a virulência, distribuição geográfica e preferência hospedeiro (FUNGARO et al., 1996; HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1993).

Segundo Boucias et al. (1982) a ampla variabilidade natural dos fungos entomopatogênicos, possibilita um aumento da capacidade adaptativa das linhagens às flutuações bióticas e abióticas do ambiente. Provavelmente, este polimorfismo genético permita a *B. bassiana* apresentar níveis de sensibilidade diferenciados aos produtos fitossanitários, como no caso de fungicidas, e até agrupá-los de acordo com esta sensibilidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade de diferentes isolados de *B. bassiana*, em relação ao fungicida azoxistrobina e verificar se há correlação entre o perfil molecular dos isolados e o nível de sensibilidade ao fungicida.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Obtenção e Multiplicação dos Conídios

Para o estudo da seleção dos isolados de *B. bassiana* quanto à sensibilidade ao fungicida azoxistrobina (Amistar 500 WG - 500g de ia kg⁻¹), utilizaram-se 33 isolados provenientes de vários hospedeiros e origens geográficas, os quais estão armazenados no Banco de Entomopatógenos, da Universidade Estadual de Londrina (Tabela 1).

Para recuperar a capacidade infectiva dos isolados, os conídios produzidos em meio completo (MC) (Alves et al., 1998), foram inoculados sobre indivíduos adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (VELEZ et al., 1997). Após a morte, os insetos foram lavados com solução de hipoclorito (1%) e acondicionados individualmente em câmara úmida para estimular a produção de conídios. Os conídios produzidos sobre o corpo dos insetos foram repicados em placas de Petri contendo MC, por duas vezes consecutivas, para eliminação de possíveis contaminantes. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada (25±1°C e fotoperíodo de 12 horas) por 15 dias. Utilizou-se nos experimentos apenas conídios de segunda repicagem e que apresentaram germinação acima de 95% em testes de viabilidade.

3.3.2 Obtenção de Colônias Monospóricas

Após reativação dos isolados, procedeu-se à obtenção de colônias monospóricas, para evitar possíveis misturas de isolados durante o isolamento. Para isso, utilizou-se a técnica de unidades formadoras de colônia (UFC), onde a colônia formada é originada de um único conídio. Sobre placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo aproximadamente 20 mL de MC, inoculou-se 0,1 mL de uma suspensão de conídios contendo 1x10² conídios mL⁻¹ em solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V⁻¹) e em seguida, espalhou-se a suspensão com auxílio da alça de Drigalski.

Passadas 96 horas, escolheu-se aleatoriamente uma colônia, que foi recortada e transferida para outra placa de Petri contendo MC. Sete dias após a transferência realizou-se nova repicagem. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas) por 15 dias.

3.3.3 Estimativa da Concentração Inibitória de Conídios a ser Utilizada para a Seleção

O isolado CG 432, selecionado por Neves e Hirose (2005) para o controle da broca-do-cafeeiro *Hypothenemus hampei*, foi escolhido como padrão, para estimar a concentração inibitória (CI) nos testes de seleção. Para determinar a CI_{50} , (concentração do produto comercial que iniba 50% da germinação dos conídios), previamente determinou-se às concentrações que provocassem cerca 10% e 90% de inibição dos conídios, para posterior distribuição das dosagens entre estas pré-determinadas, seguindo metodologia de Robertson (1984).

A estimativa da concentração inibitória do isolado CG 432 ao fungicida azoxistrobina, foi feita por meio de teste de germinação, em que se utilizou placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de MC, onde inoculou-se 0,1 mL da suspensão de conídios contendo 1×10^7 conídios mL^{-1} em solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V⁻¹). Após a secagem da suspensão inoculou-se 0,1 mL da calda do produto espalhando-se com alça de Drigalski. No controle, aplicou-se sobre a suspensão de conídios apenas solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V⁻¹). Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas).

A avaliação da germinação foi realizada com auxílio microscópio óptico (aumento de 400 vezes), 22 horas após a inoculação. Quantificou-se o número de conídios germinados e não germinados em dois campos por repetição, observando-se aproximadamente 100 conídios por campo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

3.3.4 Seleção dos Isolados

Conídios dos isolados a serem selecionados (Tabela 1) foram padronizados em suspensões de 1×10^7 conídios mL^{-1} e submetidos ao contato com o produto na concentração de 5 g L^{-1} p.c. A forma de inoculação, condições de manutenção do experimento, número de repetições por tratamento, modo e período de avaliação foram os mesmos descritos no experimento anterior (3.3.3). Os dados de inibição em porcentagem foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. A partir dos resultados obtidos, separaram-se os isolados em dois grupos, sensíveis e tolerantes ao fungicida.

3.3.5 Caracterização Molecular dos Isolados

A caracterização molecular por RAPD foi feita para os isolados de *B. bassiana* do grupo considerado tolerante e do grupo sensível ao fungicida azoxistrobina. A técnica utilizada foi a de RAPD. Para a extração de DNA, cerca de 1.0×10^7 conídios foram inoculados em 50 mL de Meio Completo Líquido (PONTECORVO et al., 1953). As culturas foram mantidas a 180 rpm por 72 horas a 28°C . O micélio foi coletado por filtração e lavado com água destilada autoclavada. Os ácidos nucléicos foram extraídos conforme Azevedo et al. (2000).

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 25 μL contendo: 2,5 μL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 2,5 μL dNTP (2,5 mM), 2,5 μL primer (Operon Technologies – 2,5 mM), 7,5 μL MgCl_2 (10 mM), 0,2 μL Taq DNA polymerase ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), 2,0 μL de DNA ($5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), e 5,8 μL de água bidestilada. As reações foram submetidas à amplificação em termociclador PTC-100 MJ Research, seguindo-se um programa composto por 3 ciclos de: 40 segundos a 92°C (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 40°C (pareamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), sendo que após todos os ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C . Os produtos amplificados foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose 1,4% que posteriormente foi corado com brometo de etídeo ($5 \mu\text{L mL}^{-1}$). Para a análise da similaridade genética entre os indivíduos foi utilizado o programa computacional NTSYS-PC (ROHLF, 2002), por meio do coeficiente de Jaccard (J) e pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar a CI_{50} , (concentração do produto comercial que inibe 50% da germinação dos conídios), seriam determinadas previamente as concentrações que provocassem cerca 10% e 90% de inibição dos conídios, para posterior distribuição das dosagens entre estas pré-determinadas, seguindo metodologia de Robertson (1984). No entanto, não foi possível a determinação da concentração que inibisse 90% da germinação dos conídios, pois acima da concentração de 5 g L^{-1} , que provocava inibição de aproximadamente 20% da germinação dos conídios, cristais da formulação, provavelmente pela saturação da suspensão, impossibilitaram a visualização dos conídios ao microscópio, sobre o meio de cultura. Assim, optou-se por utilizar na seleção, uma dose que inibiu aproximadamente 20% da germinação dos conídios para o isolado CG 432 e igual a 5 g L^{-1} produto comercial.

3.4.2 Seleção dos Isolados

Para os 33 isolados testados, a porcentagem de inibição da germinação de *B. bassiana* variou entre 3 e 81% aproximadamente (Tabela 1). Para oito isolados a inibição da germinação foi superior a 30%, sendo considerados como sensíveis à azoxistrobina. Entre eles, estão os isolados CG 21, CG 481, CB 84, CG 460, CB 17 e CB 39 que mostraram os maiores percentuais de inibição de 32,40; 33,60; 38,28; 42,94; 41,32 e 80,53% respectivamente, diferindo estatisticamente do isolado padrão CG 432 pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Sete isolados foram selecionados como tolerantes (CB 102 e UNIOESTE 4, UEL 55, CG 458, CB 35, CB 87e UEL 101), pois apresentaram baixa taxa de inibição da germinação de conídios, que variou entre 3 e 10,54% (Tabela 1). Para os demais isolados, ocorreram níveis de inibição que variaram de 10,99 a 29%. Estes resultados mostram uma grande variação quanto à sensibilidade ao produto azoxistrobina, ressaltando a importância de se fazer uma seleção de isolados em programas de manejo integrado de pragas, onde o controle microbiano com fungos é utilizado de forma inundativa ou inoculativa, juntamente com o controle químico.

A variabilidade entre isolados de uma mesma espécie de fungo é bastante conhecida e amplamente relatada na literatura para diversas variáveis biológicas, inclusive para a sensibilidade a produtos químicos sintéticos (OLMERT; KENNETH, 1974; PACCOLA- MEIRELLES; AZEVEDO, 1990; LIU, et al., 1993). Essa variabilidade foi utilizada por Todorova et al. (1998) para explicar, em parte, as diferentes respostas de isolados de *B. bassiana* em contato com um mesmo produto químico. Esta característica foi observada também em trabalho de Shapiro-Ilan et al. (2002), que constataram uma variação natural de desenvolvimento micelial em todos os isolados de *B. bassiana* estudados, quando em contato com fungicidas. Estes autores constataram baseados na formação das colônias, que o isolado GHA mostrou-se com baixa resistência aos fungicidas dodine, fenbuconazole e hidróxido de trifetil estanho, enquanto que, os isolados VS4, G4 e I3 foram tolerantes. Por outro lado Olmert e Keneth (1974) verificaram uma variação mínima de sensibilidade a fungicidas, entre os isolados de *B. bassiana* estudados.

Em estudos semelhantes, a ação de fungicidas químicos também variou em relação a diferentes isolados de um mesmo patógeno. Parisi et al. (1999) constataram diferenças em relação à toxicidade de quitozeno, procimidona, tiram e iprodiona sobre a inibição micelial *in vitro* de quatro isolados de *Phomopsis phaseoli* f.sp. *meridionalis* e *Phomopsis sojae* (Lehman). LaMondia e Douglas (1997) detectaram diferenças na ação dos fungicidas benomil e tiofanato metílico, vinclozolin e iprodione sobre o crescimento micelial *in vitro* de 45 isolados de *Botrytis cinerea* Pers.

Tabela 1 – Hospedeiros, procedência, porcentagem de inibição da germinação de conídios de isolados de *Beauveria bassiana* utilizados na seleção de sensibilidade ao fungicida azoxistrobina (5 gL⁻¹ do produto comercial).

Isolado	Hospedeiro	Procedência	Inibição germinação (%)	
CB 102	Solo	Cosmópolis- SP	3,74 ± 0,53	A ¹
UNIOESTE 4	<i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Cascavel- PR	4,27 ± 1,18	A ¹
UEL 55	(Hemiptera: Pentatomidae)	Londrina- PR	8,57 ± 0,45	A ¹
CG 458	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Paraná	8,62 ± 0,79	A ¹
ESALQ 447	<i>Solenopsis invicta</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Mato Grosso	8,43 ± 1,27	A*
CB 35	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Bahia	8,12 ± 1,67	A ¹
	<i>Microtheca pumctigera</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)			
UEL 101	Chrysomelidae)	Londrina- PR	10,54 ± 0,92	AB ¹
CB 87	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Goiás	9,46 ± 2,46	A ¹
UEL 22	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Londrina- PR	10,99 ± 1,73	AB
CG 02	<i>Elaeidobius</i> sp (Coleoptera: Curculionidae)	Manaus- AM	12,51 ± 2,73	AB
CG 152	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Goiânia- Go	13,21 ± 3,24	ABC
CG 212	(Coleoptera: Cerambycidae)	Caucaia- Ce	12,72 ± 3,79	AB
CB 82	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)	-	16,05 ± 0,76	ABCD
CG 26	(Coleoptera: Curculionidae)	Brasília- DF	14,52 ± 3,05	AB
CG 17	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Piracicaba- SP	13,52 ± 4,87	ABC
CG 71	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Pernambuco	16,02 ± 2,80	ABCD
UEL 01	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Londrina- PR	16,03 ± 2,92	ABCD
CG 464	<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	F. Beltrão PR	15,82 ± 4,83	ABCD
UEL 36	<i>Euschistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Londrina- PR	18,99 ± 2,01	ABCD
CG 432	(Homoptera: Membracidae)	Natal- RN	20,05 ± 1,54	ABCD
UEL 25	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Londrina- PR	17,73 ± 5,43	ABCD
UNIOESTE 5	<i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Cascavel- PR	17,33 ± 5,84	ABCD
UNIOESTE 39	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)	S. M. do Iguçu-PR	23,80 ± 2,34	BCDE
UEL 61	<i>Microtheca punctigera</i> (Coleoptera)	Londrina- PR	26,50 ± 1,92	CDE
CB 47	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera: Curculionidae)		26,12 ± 2,55	CDE
	<i>Rhammatocerus schistocercoides</i> (Orthoptera: Acrididae)	C. N. dos Parecís MT		
CG 245	Acrididae)		24,56 ± 4,23	BCDE
UNIOESTE 40	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Cascavel- PR	30,12 ± 1,42	DEF ²
CG 21	Família Pentatomidae	França	32,40 ± 1,73	EF ²
CG 138	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Recife- Pe	30,44 ± 3,88	DEF ²
CG 481	<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	R. do Pombal-BA	33,60 ± 2,49	EF ²
CB 84	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)		38,28 ± 4,05	F ²
CG 460	<i>Ommexecha virens</i> (Orthoptera: Acrididae)	Brasília- DF	42,94 ± 0,69	F ²
CB 17	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Cosmópolis- SP	41,32 ± 4,04	F ²
CB 39	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleóptera: Curculionidae)	Bahia	80,53 ± 1,61	G ²

*Médias (± erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

¹ Isolados tolerantes selecionados para caracterização molecular

² Isolados sensíveis selecionados para caracterização molecular

ESALQ- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; CG- CENARGEN; IBCB- Laboratório Controle Biológico do Instituto Biológico; UEL- Universidade Estadual de Londrina; UNIOESTE- Universidade do Oeste do Paraná

3.4.3 Caracterização Molecular dos Isolados

A extração de ácidos nucléicos permitiu detectar em todos os isolados a banda que representa o DNA genômico do fungo *B. bassiana* e em sete isolados, dentre os 16 analisados, a presença de bandas extras. Quatro padrões distintos de bandas foram observados, baseados na massa molecular e no número de bandas. Com o intuito de caracterizar a natureza destas bandas extras o isolado o material genético de um dos isolados foi investigado. Os tratamentos com RNase resultaram em degradação total das bandas extras encontradas no gel. Este resultado indica que a natureza destas bandas extras é de RNA. Um segundo tratamento enzimático foi realizado para determinar se estas bandas eram de fita simples ou de fita dupla. Para isso, uma alíquota dos ácidos nucléicos foi submetida ao tratamento com S1 nuclease, a qual tem a propriedade de degradar fita simples de ácidos nucléicos. Os resultados do tratamento mostraram que as bandas extras eram de RNA dupla fita (dsRNA), uma vez que essas bandas são resistentes ao tratamento com S1 nuclease.

A presença de dsRNA foi detectada tanto em isolados resistentes como sensíveis ao fungicida azoxistrobina, indicando não haver associação entre presença de elementos de dsRNA e sensibilidade ao fungicida azoxistrobina

Relatos da literatura descrevem que 30% dos fungos apresentam elementos de dsRNA (HUNST et al., 1986). A presença destes elementos genéticos citoplasmáticos tem sido atribuída a viroses fúngicas. A maioria das viroses de fungos tem dsRNA como genoma, e em fungos fitopatogênicos a presença destas partículas tem sido relacionada com aumento ou redução de virulência (NUSS; KOLTIN, 1990). Em fungos entomopatogênicos, são poucos os relatos sobre a presença de dsRNA. Martins et al. (1999), detectaram dsRNA em *M. flavoviridae* e Azevedo et al. (2000) em *Paecilomyces fumosoroseus*. Em ambos os casos nenhum efeito fenotípico, induzido pela presença do dsRNA, foi descrito pelos autores.

A análise de RAPD permite caracterizar acessos, detectar redundâncias em bancos de germoplasma, estimar a taxa de polimorfismo genético e ainda verificar associações entre perfis moleculares e caracteres fenotípicos.

Os isolados de *B. bassiana*, sete tolerantes (CB 102, UNIOESTE 4, UEL 55, CG 458, CB 35, CB 87 e UEL 101) e oito sensíveis ao fungicida

azoxistrobina (UNIOESTE 40, CG 138, CG 21, CG 481, CB 84, CG 460, CB 17 e CB 39) foram analisados segundo o padrão de bandas obtidos por RAPD, com o propósito de verificar se há alguma associação entre perfil molecular e resistência ao fungicida Azoxistrobina. Os quatro *primers* utilizados (OPX1, OPX3, OPX7 e OPX17) para a revelação de polimorfismos de RAPD permitiram a obtenção de um total de 51 locos de RAPD. Dentre estes, 31 locos (62%) foram polimórficos. A figura 01 ilustra o perfil de RAPD dos 15 isolados com o *primer* OPX7. A partir das marcas de RAPD pode-se estimar a similaridade genética entre os isolados. Baseando-se em índice de similaridade genética, neste trabalho o índice de Jaccard, foi possível estabelecer grupos de semelhanças e, a partir disso, buscar associações dos grupos formados com origem, hospedeiros ou características fenotípicas (Figura 2). Conforme se observa no dendrograma apresentado na Figura 2, os isolados resistentes e sensíveis estiveram dispersos nos diferentes agrupamentos de RAPD, indicando a falta de associação entre resistência ao fungicida Azoxistrobina e grupos de RAPD.

Os isolados CB 35 (R) e CB 39 (S) e os isolados UNIOESTE 4 (T) e UNIOESTE 40 (S), que apresentaram alto grau de similaridade, porém, não apresentam correlação quanto à sensibilidade ao produto, foram obtidos de mesma região geográfica ou de mesmo hospedeiro. Muitos trabalhos relacionam a homogeneidade genética dos isolados, à partir destas características (BIDOCHKA et al. 2000; BERETTA et al., 1998; CASTRILLO; BROOKS 1998; COUTEAUDIER; VIAUD 1997; EKESI et al., 1998; URTZ; RICE 1997).

Maurer (1997), utilizando a técnica de RAPD analisou 38 linhagens de *B. bassiana*, isoladas de diversos hospedeiros e diferentes regiões geográficas. Observou que isolados obtidos a partir de uma mesma família de hospedeiros dividiam-se em dois grupos. Um grupo consistia de todas as linhagens isoladas do gênero *Ostrinia*, independente da origem e o outro grupo constitui-se principalmente de linhagens isoladas do gênero *Diatraea*. Da mesma forma, isolados obtidos do gênero *Sitona*, formaram um sub-grupo distinto das demais linhagens isoladas da família Curculionidae. Segundo estes autores, os resultados mostraram que o inseto hospedeiro parece ser o fator mais importante na estrutura da população deste entomopatógeno. Glare e Inwood (1998) utilizaram métodos morfológicos e moleculares, que permitiram separar os isolados em quatro grupos. Um grupo heterogêneo contendo *B. bassiana* e *B. brongniartii* (Saccardo) procedentes tanto da

Nova Zelândia como de outros países, um segundo grupo constituído apenas por *B. bassiana* da Nova Zelândia, um terceiro grupo contendo apenas isolados de *B. brongniartii* procedentes tanto da Nova Zelândia como de outro lugares e um quarto grupo contendo outras espécies de *Beauveria*.

A existência da homogeneidade entre isolados de hospedeiros relacionados e de mesma área geográfica, possivelmente pode ser resultado de uma forte pressão de seleção por parte do inseto hospedeiro ou ambiente, sugerindo a existência de uma estreita correlação entre o tipo de hospedeiro, a distribuição geográfica e o perfil genético do entomopatógeno (St. LEGER et al., 1992).

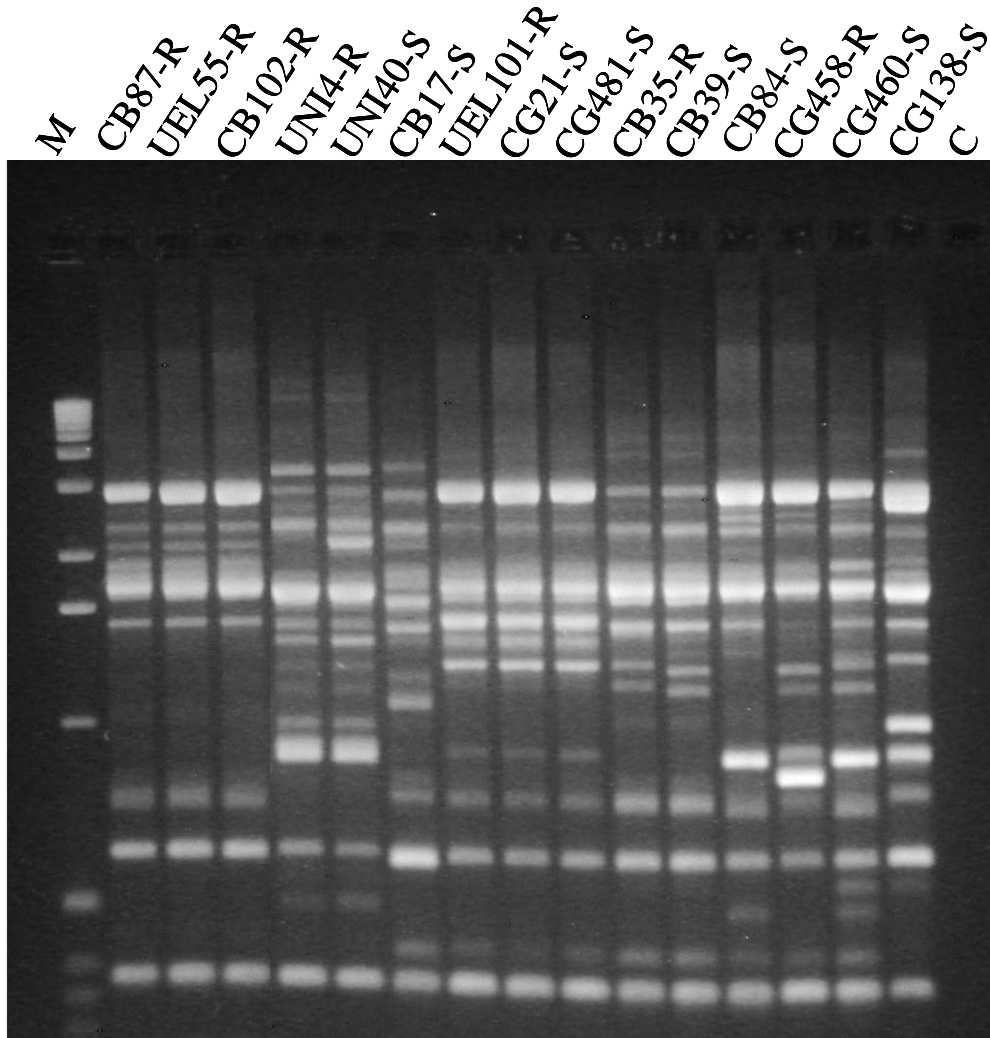


Figura 1 – Perfil eletroforético obtido a partir de 15 isolados de *Beauveria bassiana*.
M - Marcador de Peso Molecular; C - Controle negativo; S - Suscetíveis / T-tolerantes ao fungicida Azoxistrobina.

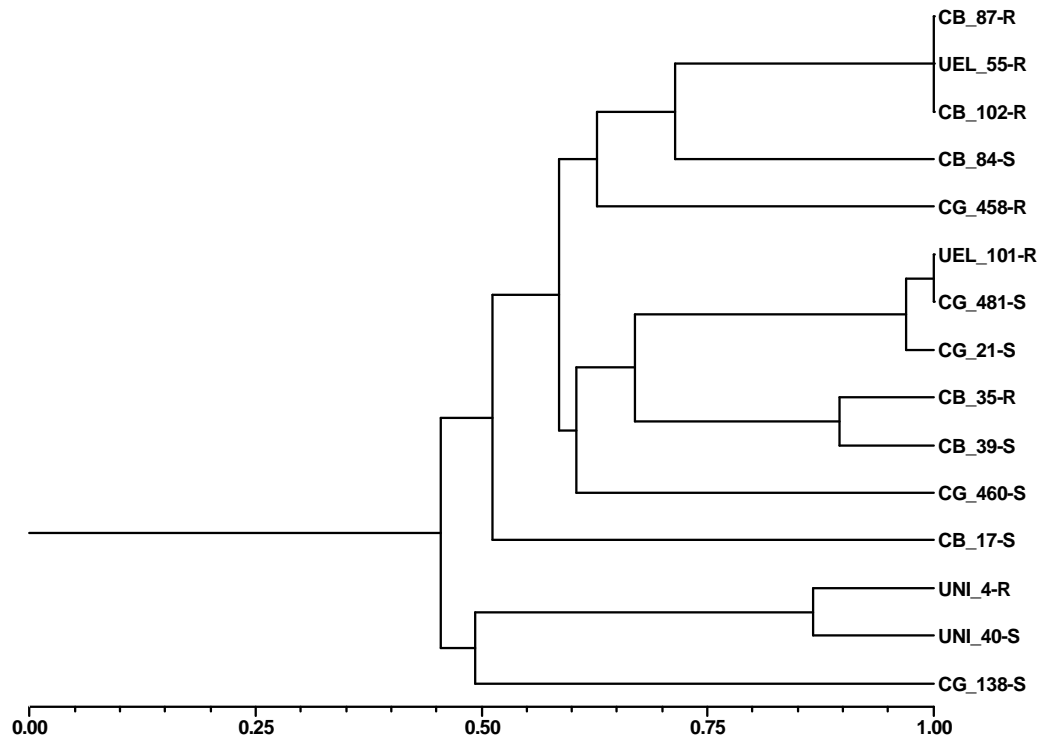


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, mostrando a relação genética entre 15 isolados de *Beauveria bassiana*. S - Suscetíveis / T- tolerantes ao fungicida Azoxistrobina.

3.5 CONCLUSÕES

- Existe variabilidade na sensibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* ao fungicida azoxistrobina em testes *in vitro*;
- Não é possível correlacionar a sensibilidade dos isolados *in vitro*, com o perfil molecular por RAPD;

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, FEALQ, p. 289-381, 1998.
- ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M.; Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 8. 217-218. 1998.
- ANDERSON, T.E.; ROBERTS, D.W. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. **Journal Economic Entomological**. 76:1437-1441. 1983.
- AZEVEDO, A.C.S.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMES, D.R.; FUNGARO, M.H.P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**. 57. 729-732. 2000.
- BERRETA, M.F. Genotypic isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.71, n.2, p.145-150, 1998.
- BIDOCHKA M.J.; MCDONALD MA; ST. LEGER RJ; ROBERTS, DW. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetic**. 25:107–113.1994.
- BIDOCHKA, M. J.;MELZER, M.J.; LAVENDER, T.M.; KAMP, A.M. Genetically related isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* harbour homologous dsRNA viruses. **Mycological Research**.104 (9). 1094-1097, 2000.
- BOUCIAS, D. G., SCHOBORG, E. A.;ALLEN, G. E. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatalis*. **Journal Invertebrate Pathology**. 39, 238– 240. 1982.
- CASTRILLO, L.A.; BROOKS, W.M. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. **Journal of Invertebrate Pathology**. 72: 190-196. 1998.

- CAVALCANTI, R.S., A. MOINO JR., G.C. SOUZA; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivo Instituto Biológico**. 69:17-22. 2002.
- CASTRILLO, L. A; VANDENBERG, J.D.; WRAIGHT, S.P. Strain specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in fields by use of sequence characterized amplified region markers. **Journal Invertebrate Pathology**. 82, 75 – 83. 2003.
- COUTEAUDIER Y, VIAUD M. New insights in population structure of *Beauveria bassiana* with regard to vegetative compatibility groups and telomeric restriction fragment length polymorphisms. **FEMS Microbiol Ecological**. 22:175–182. 1997.
- EKESI, S.; MANIANIA, N.K.; ONU, I. Effects of temperature and photoperiod on development and oviposition of the legume Bower thrips, *Megalurothrips sjostedti*. **Entomol. Exp. Appl.** 93: 149-155. 1999.
- FUNGARO, M.H.P. Diversity among soil insect isolates of *Metarhizium anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**. 22: 389-392, 1996.
- FUXA, J.R. Environmental manipulation for microbial control of insects. **Conservation Biological Control** (ed. By P. Barbosa),. Academic Press, San Diego, California. pp. 255–268. 1998.
- GLARE, T.R.; INWOOD, A.J. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* ssp. from New Zealand. **Mycological Research**. v.102, n.2, p.250-256, 1998.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Construction of cloned DNA probes for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in grasshoppers. **Journal Invertebrate Pathology**. 62: 233-240. 1993.
- HIROSE, E, NEVES, P.MO. J; ZEQUI, J.; MARTINS, C.L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO JR, A. Effect of biofertilizers and Neem Oil on the entomopatogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archieve Biologic Technology**. 44: 419-423. 2001.
- HUNST, P.L.; LATTERELL, F.M.; ROSSI, A.E. Variation in double stranded RNA from isolates of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology** .76. 674-678. 1986.

LaMONDIA, J.A.; DOUGLAS, S.M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**. 81. 729-732. 1997.

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 Invertebrate Pathology**, v.62, p.248-251, 1993.

MAURER, P. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**. v. 101, n.2, p. 159-164, 1997.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P.T.; MOINO JR, A.. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoids insecticides. **Neotropical Entomology**. 30: 263-268. 2001.

NEVES, P. M. O. J., HIROSE, E. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**. 34. 77- 88, 2005.

NORRIS R.F., CASWELL-CHEN, E.P.; KOGAN, M. Concepts in integrated pest management. New Jersey: **Prentice Hall**, 13, 337-372. 2003.

NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**. 28: 37-58. 1990.

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.

PACCOLA- MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**.(33): 657-672, 1990.

PARISI, J.J.D.; MENTEM, J.O.M.; MARTINS, M.C. Sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f.sp. *meridionalis* a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.25-30, 1999.

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

- ROBERTSON, J.L., SMITH, C.K., SAVIN, N.E., LAVIGNE, R.J. Effect of 568 dose selection and sample size on the precision lethal dose estimates in 569 dose-mortality regression. **Journal Economic Entomological**. 77, 833–837. 1984.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., REILLY, C.C., HOTCHKISS, M.W.; WOOD, B.W. The potential for enhanced fungicide resistance in *Beauveria bassiana* through strain discovery and artificial selection. **Journal Invertebrate Pathology**. 81: 86–93. 2002.
- SILVA, R.Z. ; NEVES, P. M. O. J. Techniques and parameters utilized in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and in vitro phytosanitary products. **Pest Management Science**. 61 (7): 667-674, 2005.
- ST. LEGER RJ, ALLEE LL, MAY R, STAPLES RC, ROBERTS DW. World-wide distribution of genetic variation among isolates *Beauveria* spp. **Mycological Research**. 96: 1007–1015. 1992.
- TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M.; PADULLA, L.F.L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivo Instituto Biológico**. 69 (3): 89-96.2002.
- TODOROVA, S.I.; CODERRE, D.; DUCHESNE, R.M.; COTÉ, J.C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. **Environmental Entomology**. 27: 427-433. 1998.
- URTZ, B.E.; RICE, W.C. RAPD-PCR characterization of the *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.405-409, 1997.
- VELEZ, P.E.A.; POSADA, F.J.F.; MARIN, P.M.; GONZALEZ, M.T.G., OSORIO, E.V.; BUSTILLO, A.E.P. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Cenicafé. **Boletim Técnico**. v.1, p.37, 1997.

4 ARTIGO 2 – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *BEAUVERIA bassiana* AO FUNGICIDA AZOXISTROBINA.

4.1 RESUMO

A seleção de colônias resistentes de fungos entomopatogênicos a produtos fitossanitários tóxicos, favorece o controle associado do produto químico com o biológico e, conseqüentemente, aumenta o leque de táticas de controle utilizadas no manejo integrado de pragas e doenças. Assim, este trabalho teve por objetivo induzir a resistência e caracterizar molecularmente isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. quando submetidos à pressão de seleção pelo fungicida azoxistrobina. Realizou-se uma pré-seleção de isolados, na qual selecionou-se quatro isolados sensíveis CG 460, CB17, CB 84 e CB 39 e dois tolerantes UNIOESTE 4 e CB 102. Foram realizadas 10 repicagens em contato com o fungicida na dose de 5g L⁻¹ do produto comercial. Avaliou-se o crescimento vegetativo, a produtividade de conídios, a viabilidade dos conídios produzidos e a virulência do fungo sobre insetos. Determinou-se ainda a concentração mínima inibitória (CMI) e o perfil molecular por RAPD, com o objetivo de verificar a ocorrência de alteração genética após indução. Para os isolados sensíveis CG 460 e CB 17, ocorreu o maior desenvolvimento do crescimento e produtividade de conídios da colônia induzida. Todos os isolados apresentaram aumento da viabilidade dos conídios produzidos após o processo de indução. Com exceção do isolado CB 84, os demais não apresentaram diferença na virulência quando comparadas as colônias não induzidas, mostrando que o fungo não perdeu sua capacidade infectiva. Os isolados tolerantes, mantiveram seu desenvolvimento mesmo depois de 10 repicagens. A análise do perfil molecular por RAPD do isolado CB 17 foi feita com dez primers. A maioria dos marcadores estiveram presentes nas colônias induzida e não induzida, indicando a ocorrência pouco frequente de alterações genéticas no decorrer da pressão de seleção. Esta alteração pode ser demonstrada pelo CMI, onde se observou maior produtividade de conídios para a colônia induzida na dose de 160 g L⁻¹, para todos os isolados considerados sensíveis.

Palavras- chave: Controle microbiano conservativo. Seletividade. Caracterização molecular.

RESISTANCE INDUCTION OF THE STRAIN OF *Beauveria bassiana* AZOXYSTROBIN FUNGICIDE

ABSTRACT

The selection of colonies resistance of entomopathogenic fungi to toxic pesticides, favors the control of the chemical allied with the biological and consequently increases the range of tactics to control used in integrated pest management and disease. Therefore, this study aimed to induce resistance and molecular characterize strain of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill when subjected to the pressure of selection by azoxystrobin fungicide. There was a pre-selection of strain, in which picked up four sensitive strains CG 460, CB17, CB 84 and CB 39 and two tolerant UNIOESTE 4 and CB 102. We performed 10 subcultures in contact with the fungicide at a dose of 5 g L⁻¹. It was evaluated the growth, productiveness of conidia, the viability of conidia produced and virulence of the fungus on insects. It was determined also the minimum inhibitory concentration (IMC) and the molecular profile of RAPD, with the objective to verify the occurrence of genetic alteration after induction. For the sensitive strain CG 460 and CB 17, was the further development of growth and productivity of the colony induced conidia. All strain showed increased viability of conidia produced after the process of induction. With the exception of strain CB 84, the other showed no difference in virulence when compared to the colonies not induced, showing that the fungus has not lost its ability infective. The isolates tolerant, continued their development even after 10 repicagens. The analysis of the molecular profile of the strain by RAPD CB 17 was made with ten primers. The most markers were present in the induced colonies and not induced, indicating the occurrence of rare genetic changes in the course of selection pressure. This can be demonstrated by IMC, which was observed increased productivity of conidia to the colony induced a dose of 160 g L⁻¹, for all isolates considered sensitive.

Keywords: Conservative microbial control. Selectivity. Molecular characterization.

4.2 INTRODUÇÃO

Produtos fitossanitários sintéticos utilizados na agricultura, como os fungicidas, além de serem tóxicos aos homens e animais, podem reduzir o potencial de ação dos inimigos naturais. Entre os organismos benéficos, os mais afetados pelos fungicidas são os fungos entomopatogênicos, que podem ter seu desenvolvimento inibido, sofrer mutações genéticas e provocar a diminuição da viabilidade e virulência, favorecendo, com isso, as pragas agrícolas (Alves et al., 1998).

Entre os grupos de fungicidas, classificados pelo alto risco de indução de populações resistentes de fungos, estão os benzimidazóis e estrobilurinas (BRENT; HOLLOMON, 1998; GISI et al., 2000; DELEN; TOSUN, 2003). As estrobilurinas, grupo que pertence a azoxistrobina, são consideradas de alto risco, pela sua ação específica sobre o patógenos, interferindo na respiração mitocondrial, ao bloquear a transferência de elétrons pelo complexo citocromo bc1. Neste grupo pode ocorrer a resistência cruzada para a azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina (GHINI; KIMATI, 2000).

McGrath e Shishkoff (2003) fizeram o primeiro relato de resistência a fungicidas do grupo das estrobilurinas para oídio, causada por *Podosphaera xanthii* (Castagne) nos Estados Unidos. Observou-se também a redução drástica no controle da doença em vários locais onde houve predominância ou exclusividade ao uso de estrobilurinas.

A grande diversidade das populações de fungos e sua intensa capacidade de multiplicação fornecem uma ampla oportunidade para a seleção de linhagens resistentes. Assim, numa população sensível a um determinado produto, colônias com menor sensibilidade se propagam devido a mutações ou outro mecanismo de variabilidade (GHINI; KIMATI, 2000).

O reconhecimento de linhagens resistentes de fungos é feito por meio da comparação dos dados de linhagens sensíveis, em testes de sensibilidade denominados “base-line” e visam obter dados da variabilidade inicial do patógeno quanto à sensibilidade ao fungicida. Essas informações servem como referência para uma futura avaliação da ocorrência de resistência (AZEVEDO; OLIVEIRA, 2003).

Há duas técnicas que podem ser utilizadas para avaliar resistência aos fungicidas. Podem ser simples e rápidas como o cultivo de esporos em meio de cultura, por meio da análise da germinação ou mais sofisticadas, como a utilização de rastreamento de mutação por técnicas moleculares, como o PCR (RAPOSO, et al., 1994). Fraaije et al. (2002) promoveram seleção de isolados resistentes de *Blumeria (Erysiphe) f.sp. tritici* para o fungicida azoxistrobina e desenvolveram um diagnóstico por meio da técnica de PCR, na qual identificou o alelo responsável pela característica de resistência.

Considerando que a utilização de alguns produtos fitossanitários pode prejudicar a ação dos fungos entomopatogênicos, torna-se necessária a realização de estudos com o intuito de selecionar linhagens resistentes a esses produtos (LOUREIRO, 2001). Como consequência, tais linhagens poderão ser utilizadas para produção em larga escala, favorecendo o controle associado do produto químico com o biológico, preservando e conservando o patógeno na lavoura. A conservação é realizada para diminuir a desativação do fungo entomopatogênico e, conseqüentemente, aumentar o leque de táticas de controle utilizadas no manejo integrado de pragas e doenças.

Assim, este trabalho teve por objetivo induzir a resistência de isolados de *B. bassiana* ao fungicida azoxistrobina.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Estimativa da Concentração de Azoxistrobina Responsável pela Inibição da Germinação de Conídios de *Beauveria Bassiana*

O isolado de *Beauveria bassiana* CG 432, proveniente do banco de entomopatógenos da Universidade Estadual de Londrina e selecionado por Neves e Hirose (2005) para o controle da broca-do-cafeeiro, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), foi escolhido como padrão, para estimar a concentração inibitória (CI) a ser utilizada nos testes para a seleção de isolados sensíveis ao fungicida azoxistrobina. Para determinar a CI_{50} , concentração do produto comercial responsável por inibir 50% da germinação dos conídios, buscou-se determinar as concentrações que provocassem cerca de 10% e 90% de inibição dos conídios, para posterior distribuição das concentrações, entre estes extremos, seguindo metodologia proposta por Robertson et al. (1984).

A estimativa da concentração inibitória foi feita por meio de teste de germinação, em que se utilizou placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de meio completo (MC) (Alves, 1998), onde inoculou-se 0,1 mL da suspensão de conídios contendo 1×10^7 conídios mL^{-1} em solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V^{-1}). Após a secagem da suspensão inoculou-se 0,1 mL da calda do produto. Para espalhar a suspensão de conídios e a calda do produto sobre a placa, utilizou-se alça de Drigalski. No controle aplicou-se sobre a suspensão de conídios apenas solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V^{-1}). Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ C$ e fotófase de 12 horas).

A avaliação da germinação foi realizada com auxílio de microscópio óptico (aumento de 400 vezes) 22 horas após a inoculação. Quantificou-se o número de conídios germinados e não germinados, em dois campos por repetição, onde observou-se aproximadamente 100 conídios por campo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições para cada isolado.

4.3.2 Pré-seleção dos Isolados de *B. bassiana* Sensíveis

Para pré-seleção de isolados sensíveis a azoxistrobina foram utilizados 33 isolados monospóricos, provenientes do Banco de Entomopatógenos da Universidade Estadual de Londrina (Tabela 1). Realizou-se teste de germinação de conídios, como descrito no item 4.3.1, em que cada isolado foi submetido ao contato com o fungicida azoxistrobina, na concentração de 5 g L⁻¹ do produto comercial (p.c.) comparando-se o percentual de inibição da germinação para cada isolado, em relação ao isolado padrão CG 432.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Separou-se os isolados em dois grupos, tolerantes, com inibição de germinação abaixo de 5%, e sensíveis, com inibição da germinação acima de 35%. Destes, selecionou-se para a realização da indução de resistência, quatro isolados sensíveis e dois tolerantes, para verificar se houve alguma alteração no seu desenvolvimento, com o decorrer das repicagens (Tabela 1).

Tabela 1 – Hospedeiros e procedência dos isolados de *Beauveria bassiana* utilizados na pré-seleção de sensibilidade ao fungicida azoxistrobina.

Isolado	Hospedeiro	Procedência	Inibição germinação (%)	
CB 102	Solo	Cosmópolis- SP	3,74 ± 0,53	A ¹
UNIOESTE 4 ^e	<i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Cascavel- PR	4,27 ± 1,18	A ¹
UEL 55	(Hemiptera: Pentatomidae)	Londrina- PR	8,57 ± 0,45	A
CG 458	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Paraná	8,62 ± 0,79	A
ESALQ 447 ^a	<i>Solenopsis invicta</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Mato Grosso	8,43 ± 1,27	A*
CB 35	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Bahia	8,12 ± 1,67	A
UEL 101	<i>Microtheca pumctigera</i> (Coleoptera: Chrysomelidade)	Londrina- PR	10,54 ± 0,92	AB
CB 87	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Goiás	9,46 ± 2,46	A
UEL 22	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Londrina- PR	10,99 ± 1,73	AB
CG 02	<i>Elaeidobius</i> sp (Coleoptera: Curculionidae)	Manaus- AM	12,51 ± 2,73	AB
CG 152	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Goiânia- Go	13,21 ± 3,24	ABC
CG 212	(Coleoptera: Cerambycidae)	Caucaia- Ce	12,72 ± 3,79	AB
CB 82	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)		16,05 ± 0,76	ABCD
CG 26	(Coleoptera: Curculionidae)	Brasília- DF	14,52 ± 3,05	AB
CG 17 ^b	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Piracicaba- SP	13,52 ± 4,87	ABC
CG 71	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Pernambuco	16,02 ± 2,80	ABCD
UEL 01 ^d	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Londrina- PR	16,03 ± 2,92	ABCD
CG 464	<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	F. Beltrão PR	15,82 ± 4,83	ABCD
UEL 36	<i>Euschistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Londrina- PR	18,99 ± 2,01	ABCD
CG 432	(Homoptera: Membracidae)	Natal- RN	20,05 ± 1,54	ABCD
UEL 25	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Londrina- PR	17,73 ± 5,43	ABCD
UNIOESTE 5	<i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Cascavel- PR	17,33 ± 5,84	ABCD
UNIOESTE 39	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	PR	23,80 ± 2,34	BCDE
UEL 61	<i>Microtheca punctigera</i> (Coleoptera)	Londrina- PR	26,50 ± 1,92	CDE
CB 47	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera: Curculionidae)		26,12 ± 2,55	CDE
CG 245	<i>Rhammatocecus schistocercoides</i> (Orthoptera: Acrididae)	C. N. dos Parecís MT	24,56 ± 4,23	BCDE
UNIOESTE 40	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Cascavel- PR	30,12 ± 1,42	DEF
CG 21	Família Pentatomidae	França	32,40 ± 1,73	EF
CG 138	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Recife- Pe	30,44 ± 3,88	DEF
CG 481	<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	R. do Pombal-BA	33,60 ± 2,49	EF
CB 84	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)		38,28 ± 4,05	F ²
CG 460	<i>Ommexecha virens</i> (Orthoptera: Acrididae)	Brasília- DF	42,94 ± 0,69	F ²
CB 17 ^c	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Cosmópolis- SP	41,32 ± 4,04	F ²
CB 39	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Bahia	80,53 ± 1,61	G ²

*Médias (± erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

¹ Isolados tolerantes selecionados para indução resistência

² Isolados sensíveis selecionados para indução resistência

ESALQ- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; CG- CENARGEN; IBCB- Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico; UEL Universidade Estadual de Londrina; UNIOESTE- Universidade do Oeste do Paraná

4.3.3 Indução de Resistência à Azoxistrobina, dos Isolados Previamente Seleccionados

Para indução da resistência, os isolados sensíveis e tolerantes foram inoculados, em meio de cultura (M.C.) como descrito no item anterior, realizou-se 10 repicagens consecutivas para cada isolados, sendo que, o intervalo de uma repicagem para outra, foi realizado a cada sete dias. Foram feitos dois tratamentos, um utilizando uma concentração padrão de 5 g L⁻¹ produto comercial e um tratamento controle, utilizando apenas água destilada (sem indução- SI), para verificar a ocorrência de alguma alteração no desenvolvimento com o decorrer das repicagens, mesmo sem a adição de produto. O delineamento foi o inteiramente casualizado com cinco repetições.

Em cada repicagem, para cada isolado, avaliou-se o crescimento vegetativo (CV) e a produtividade de conídios (PC). Os testes de germinação para avaliar a viabilidade dos conídios produzidos pelos isolados, foram avaliados na 1º, 3º, 5º, 7º, 9º e 10º repicagem. Testou-se também a virulência dos conídios produzidos na 1º, 5º e 10º repicagens por meio de bioensaios com insetos-teste.

Após a 10ª repicagem realizou-se um teste que mediu a concentração mínima inibitória (CMI), para verificar se a indicação de resistência realizada resultou em alteração gênica ou fisiológica. Para comparar as características genéticas dos isolados induzidos e não induzidos, realizou-se análise molecular pela técnica do RAPD.

4.3.3.1 Crescimento vegetativo

Em placas de Petri contendo MC, foram inoculados os isolados sensíveis pré-seleccionados (CG 460, CB 17, CB 39, CB 84) e os tolerantes, (UNIOESTE 4 e CB 102). Para cada isolado foi feito um tratamento com fungicida, na qual se inoculou 0,1 mL da calda (5g L⁻¹ p.c). (dose padrão), espalhando em seguida com auxílio de alça de Drigalski e um tratamento controle (SI), utilizando apenas água destilada. Cada isolado foi repicado em três pontos equidistantes por

placa, em cinco repetições (placas). Após 15 dias de incubação em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas), avaliou-se aleatoriamente, o diâmetro médio (cm) de uma colônia por placa.

Os experimentos foram conduzidos em parcelas subdivididas (indução nas parcelas e repicagem nas subparcelas) em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F seguida do Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A homogeneidade de variâncias foi testada pelo Teste de Hartley e as transformações foram calculadas segundo metodologia de Box e Cox, descrita em Barbin (2003). Os dados de crescimento foram transformados em raiz quadrada de x.

4.3.3.2 Produtividade de conídios

Com um vazador circular ($1,76\text{ cm}^2$) foi recortado o centro das mesmas colônias avaliadas no crescimento vegetativo. Para a contagem do número de conídios, as colônias foram colocadas em solução aquosa de Tween 20 a 0,02% (V V^{-1}) e agitadas em Vortex por um minuto. Realizaram-se diluições necessárias para a quantificação dos conídios em câmara de Neubauer seguindo metodologia de Alves et al. (1998).

Os experimentos foram realizados em parcelas subdivididas (indução nas parcelas e repicagem nas subparcelas) em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância pelo Teste F seguida do Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A homogeneidade de variâncias foi testada pelo Teste de Hartley e as transformações foram calculadas segundo metodologia de Box e Cox, descrita em Barbin, 2003. Os dados de produtividade foram transformados em $\log(x)$.

4.3.3.3 Viabilidade dos conídios

A viabilidade foi avaliada por meio do teste de germinação dos conídios, onde a forma de inoculação, condições de manutenção do experimento, delineamento estatístico, número de repetições por isolado, modo e período de avaliação foram os mesmos descritos no item 4.3.1.

4.3.3.4 Teste de virulência

4.3.3.4.1 *Obtenção dos insetos*

Para os testes de virulência foram utilizados apenas insetos adultos da espécie *Sitophilus zeamais* (Mots). No dia anterior a montagem dos experimentos, os insetos foram coletados em grãos de milho infestados, mantidos no Laboratório de Entomologia, da Universidade Estadual de Londrina. Foram separados do substrato (milho) e acondicionados em placas de Petri de acrílico, alimentados com pequenas porções de quirela de milho e mantidos em condição ambiente.

4.3.3.4.2 *Bioensaio*

Utilizaram-se nos bioensaios, conídios provenientes de colônias induzidas (fungicida) e não induzidas (SI) de cada isolado. Preparou-se uma suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} em solução aquosa com Tween 20 a 0,02% (V V⁻¹), concentração que provocou para o isolados UNIOESTE 4 mortalidade confirmada de aproximadamente 50% de *S. zeamais* (POTRICH, et al., 2006).

Os insetos adultos foram pulverizados com 0,1 mL da suspensão de conídios, com auxílio do pulverizador Airbrush®, acoplado a um

compressor/aspirador Fanen-Diapump. Para cada colônia foram feitas cinco repetições com 100 insetos, totalizando 500 insetos por tratamento (colônia), seguindo recomendação de Robertson et al. (1984), para a realização de bioensaios.

Após a pulverização, os insetos foram acondicionados em placas de Petri de acrílico (9 cm diâmetro) e alimentados com aproximadamente dois gramas de quirela de milho. As placas foram mantidas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas).

As avaliações foram realizadas diariamente por um período de quinze dias. Os insetos mortos foram lavados em solução de hipoclorito (1%) e acondicionados em câmara úmida ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas), por 10 dias, para a confirmação da mortalidade. Os dados de porcentagem da mortalidade confirmada corrigida foram determinados descontando da mortalidade da testemunha. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.3.3.5 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Finalizada a pressão de seleção sobre os isolados sensíveis e tolerantes selecionados previamente. Todos os isolados, tanto os induzidos como os não induzidos, foram repicados em placas de Petri contendo apenas MC e acondicionados por 15 dias em câmara climatizada a $25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Para CMI, foram feitas distribuições de doses, para se estimar a dose na qual o entomopatógeno não tenha capacidade de crescer vegetativamente e que não apresente produção de conídios. Foram utilizadas concentrações de 5 g L^{-1} , 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} , 40 g L^{-1} , 80 g L^{-1} , 120 g L^{-1} e 160 g L^{-1} do p.c. Para todas as colônias foram feitos um controle sem a adição de fungicida. Em placas de Petri contendo MC, pipetou-se 0,1 mL da concentração do produto e distribuiu uniformemente na placa com auxílio da alça de Drigalski, após secagem da calda, repicou-se o fungo em um único ponto centralizado na placa. Para cada

concentração do produto, repicou-se tanto a colônia induzida como a não induzida, separadamente. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições (placas).

Após 15 dias de incubação ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas), avaliou-se, o diâmetro médio (cm) da colônia de cada placa e a produtividade de conídios referentes ao controle e a concentração de 160 g L^{-1} . Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.3.3 Comparação do Perfil Genético por Rapd das Colônias Induzidas e Não Induzidas

Somente um isolado foi utilizado na caracterização molecular, em que se comparou uma colônia induzida pelo fungicida azoxistrobina por 10 repicagens e outra colônia não induzida.

A técnica utilizada foi a de RAPD. Para a extração de DNA cerca de 1.0×10^7 conídios foram inoculados, em 50 mL de Meio Completo Líquido (PONTECORVO et al., 1953). As culturas foram mantidas a 180 rpm por 72 horas a 28°C . O micélio foi coletado por filtração e lavado com água destilada autoclavada. Os ácidos nucleicos foram extraídos conforme Azevedo et al. (2000).

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 25 μL , contendo: 2,5 μL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl) ; 2,5 μL dNTP (2,5 mM), 2,5 μL primer (Operon Technologies – 2,5 mM), 7,5 μL MgCl_2 (10 mM), 0,2 μL Taq DNA polymerase (5 U μL^{-1}), 2,0 μL de DNA (5 ng μL^{-1}), e 5,8 μL de água bidestilada. As reações foram submetidas a amplificação, em termociclador PTC-100 MJ Research, seguindo-se um programa composto por 3 fases: 40 segundos a 92°C (desnaturação), 1,5 minutos a 40°C (pareamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), sendo que após todos os ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C . Os produtos de RAPD foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% e posteriormente o gel foi corado com brometo de etídeo (5 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

4.4 Resultados e Discussões

Para determinar a CI_{50} , (concentração do produto comercial que inibe 50% da germinação dos conídios), previamente seriam determinadas as concentrações que provocassem cerca 10% e 90% de inibição da germinação dos conídios, para posterior distribuição das dosagens entre estas pré-determinadas, seguindo metodologia de Robertson (1984) e desta maneira, obter a CI_{50} . No entanto, não foi possível a determinação da concentração que inibisse 90% da germinação dos conídios, pois acima da concentração de 5 gL^{-1} , que provocava inibição de aproximadamente 20% dos conídios, cristais da formulação, provavelmente pela saturação da suspensão, impossibilitaram a visualização dos conídios ao microscópio, sobre o meio de cultura. Assim, optou-se por utilizar na seleção, uma dose que inibiu aproximadamente 20% da germinação dos conídios para o isolado CG 432 e igual a 5 g L^{-1} produto comercial.

4.4.1 Crescimento Vegetativo

Verificou-se que para as colônias induzidas dos isolados de *B. bassiana* UNIOESTE 4 e CB 102, tolerantes ao fungicida azoxistrobina (T), a partir da sexta repicagem, não apresentaram diferença estatística em relação ao crescimento vegetativo (CV) (Tabela 2). Com o término da pressão de seleção, também não se observou diferença estatística entre as colônias induzidas e não induzidas, o que mostra uma tendência de adaptação do fungo ao efeito deletério do fungicida.

Entre os sensíveis (S), os isolados CG 460 e CB 17 apresentaram maior CV na comparação entre repicagens e em relação à colônia não induzida (Tabela 2). Para o isolado CG 460 (S), notou-se que o CV não apresentou diferença estatística entre as repicagens para as colônias induzidas, diferindo somente na primeira repicagem (Fig 1; Tab 2).

Já o isolado CB 39 (S) induzido, não diferiu estatisticamente durante o processo de repicagens, apresentando diferença estatística apenas na

comparação entre colônias não induzidas e as induzidas na décima repicagem. O isolado CB 84 (S) na comparação entre as colônias não induzidas e induzidas, nas diferentes repicagens, também apresentou diferenças entre as colônias, no entanto, este isolado apresentou menor desenvolvimento das colônias induzidas, em relação aos demais isolados (Tabela 2). Estes resultados mostram que pode haver uma adaptação diferenciada de isolados quando sob pressão de um agente deletério externo, no caso o fungicida azoxistrobina. Entretanto, a adaptação ou não, avaliada pelo crescimento vegetativo, pode não ter correlação com outras variáveis, como a produção de conídios e a virulência (ZIMMERMANN, 1975).

No geral, com a pressão de seleção, em relação à variável crescimento vegetativo, os isolados não apresentaram melhora no seu desenvolvimento.

Tabela 2 – Média do crescimento vegetativo (cm²) (\pm EP) das colônias dos isolados de *Beauveria bassiana* em placas contendo MC com 5 gL⁻¹ do fungicida azoxistrobina, incubados por 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

Rep.*	ISOLADOS											
	UNIOESTE 4 (T)				CB 102 (T)				CG 460 (S)			
	SI		I		SI		I		SI		I	
1	13,47 \pm 1,13	Aa**	6,39 \pm 0,24	Cb	14,99 \pm 0,60	BCa	8,90 \pm 0,46	Cb	13,99 \pm 0,89	BCDa	5,21 \pm 1,00	Cb
2	8,51 \pm 0,85	Ba	8,91 \pm 2,82	BCa	13,11 \pm 0,58	Ca	12,99 \pm 0,69	ABa	13,43 \pm 0,47	CDa	13,51 \pm 1,02	Aa
3	14,86 \pm 0,19	Aa	9,81 \pm 0,80	BCb	16,17 \pm 1,04	ABCa	11,76 \pm 0,82	Bb	11,58 \pm 1,00	Da	9,08 \pm 0,93	Ba
4	13,68 \pm 1,16	Aa	8,28 \pm 0,35	Cb	17,75 \pm 1,07	Aba	10,83 \pm 0,13	BCb	16,14 \pm 0,23	ABCa	10,81 \pm 0,19	ABb
5	15,46 \pm 0,82	Aa	9,43 \pm 0,40	BCb	17,86 \pm 0,76	Aba	11,73 \pm 0,56	ABb	15,91 \pm 0,53	ABCa	12,12 \pm 0,52	ABa
6	16,51 \pm 0,72	Aa	10,89 \pm 0,94	ABb	17,51 \pm 1,10	Aba	13,30 \pm 0,54	ABb	17,99 \pm 0,88	ABa	11,55 \pm 1,14	ABb
7	15,74 \pm 1,55	Aa	10,42 \pm 0,61	ABb	19,01 \pm 0,89	Aa	12,36 \pm 1,07	ABb	15,56 \pm 0,53	ABCDA	11,58 \pm 0,41	ABb
8	13,71 \pm 1,42	Aa	12,21 \pm 0,20	Aba	16,99 \pm 0,55	Aba	14,04 \pm 0,68	Ab	15,21 \pm 0,52	ABCDA	11,50 \pm 0,83	ABb
9	16,19 \pm 1,33	Aa	11,57 \pm 0,31	ABb	15,57 \pm 0,72	ABCa	14,21 \pm 0,70	Ab	19,05 \pm 1,65	Aa	13,40 \pm 1,42	Ab
10	15,80 \pm 0,64	Aa	13,61 \pm 0,74	Aa	15,01 \pm 0,99	BCa	14,55 \pm 0,37	Aa	16,75 \pm 0,52	ABCa	12,49 \pm 0,25	Ab

*Rep.- repicagem; SI- sem indução (sem adição produto); I-indução (fungicida); T- tolerante; S-sensível;

**Médias (\pm erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Tabela 2 (Cont.) – Média do crescimento vegetativo (cm²) (± EP) das colônias dos isolados de *Beauveria bassiana* em placas contendo MC com 5 gL⁻¹ do fungicida azoxistrobina, incubados por 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

ISOLADOS												
Rep.*	CB 39 (S)				CB 17 (S)				CB 84 (S)			
*	SI	I			SI	I			SI	I		
1	14,55 ± 0,82**	BCDa	6,02 ± 0,46	Bb	13,86 ± 0,19	CDa	6,41 ± 0,81	Cb	15,24 ± 1,04	ABa	10,99 ± 0,48	BCb
2	12,46 ± 0,27	Da	11,46 ± 0,87	Aa	11,07 ± 0,78	Da	11,80 ± 0,31	Aa	14,90 ± 1,05	ABa	9,70 ± 1,66	Cb
3	18,86 ± 1,44	Aa	11,26 ± 1,03	Ab	15,82 ± 1,02	BCa	11,96 ± 1,16	Ab	16,15 ± 0,47	ABa	11,26 ± 1,01	BCb
4	17,33 ± 0,76	ABa	10,69 ± 0,35	Ab	17,13 ± 0,98	BCa	9,15 ± 0,31	ABb	16,51 ± 0,60	ABa	13,30 ± 0,54	ABb
5	19,03 ± 1,30	Aa	13,13 ± 0,30	Ab	16,89 ± 1,00	BCa	6,62 ± 0,30	BCb	14,03 ± 2,31	ABa	15,29 ± 1,29	Aa
6	17,11 ± 0,60	ABCa	11,29 ± 0,63	Ab	19,03 ± 1,23	Aba	9,70 ± 0,84	ABb	18,49 ± 0,65	Aa	11,23 ± 0,73	BCb
7	13,43 ± 0,47	CDa	12,92 ± 0,77	Ab	18,05 ± 1,74	ABCa	10,66 ± 0,33	Ab	15,45 ± 0,58	ABa	5,97 ± 1,90	Db
8	16,16 ± 0,78	ABCDa	13,62 ± 0,38	Ab	17,00 ± 0,76	Bca	9,98 ± 0,35	ABb	14,28 ± 1,71	ABa	8,89 ± 0,29	Cb
9	17,00 ± 0,84	ABCa	12,91 ± 0,73	Ab	23,10 ± 1,60	Aa	11,00 ± 0,69	Ab	16,28 ± 0,74	ABa	9,22 ± 0,92	Cb
10	19,39 ± 0,90	Aa	11,52 ± 0,64	Ab	15,48 ± 1,21	BCa	12,27 ± 0,48	Ab	13,11 ± 0,53	Ba	3,77 ± 0,20	Db

*Rep.- repicagem; SI- sem indução; I-indução; S-sensível.

* Médias (± erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

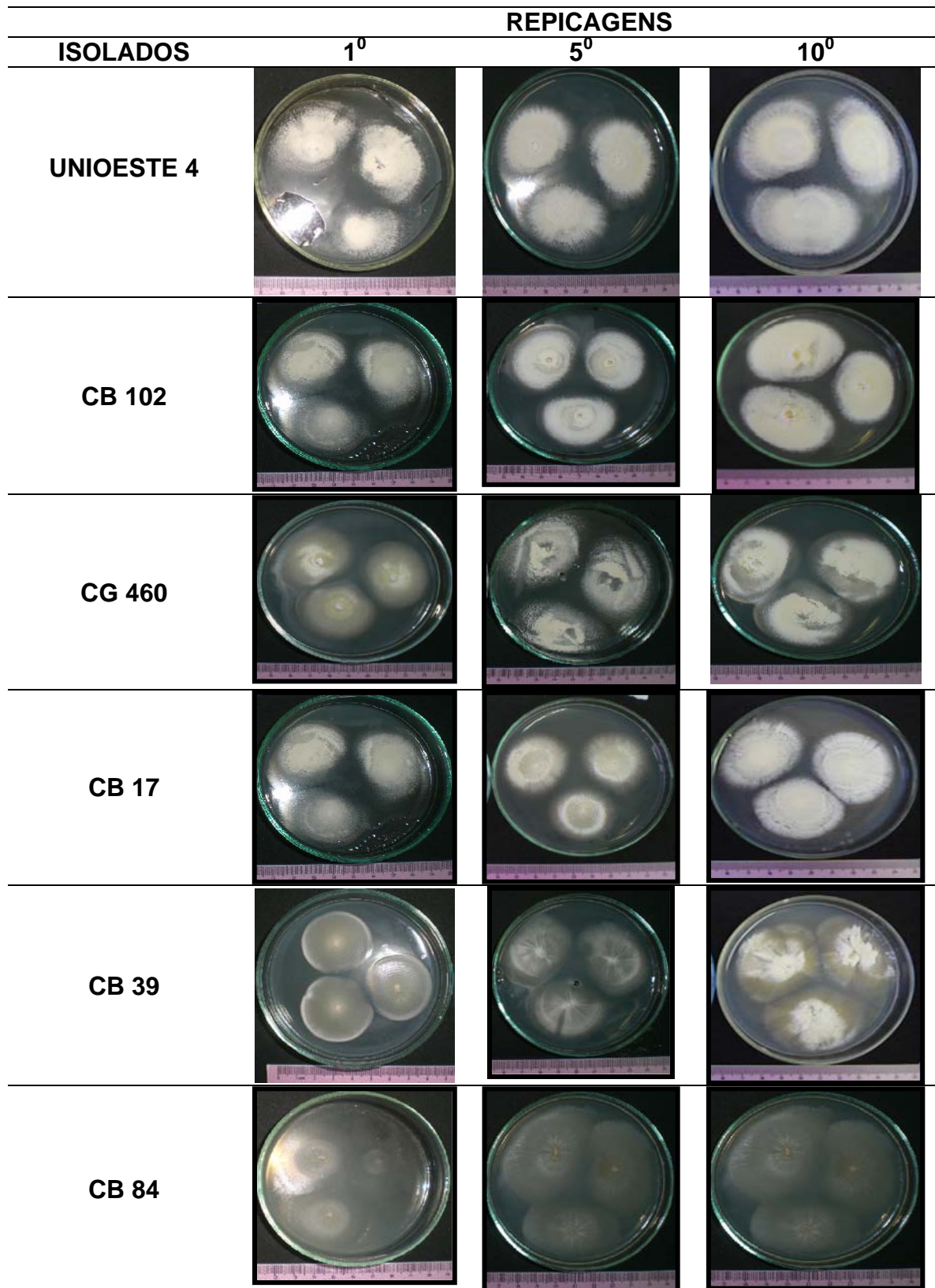


Figura 1 – Crescimento vegetativo de colônias induzidas de isolados de *B. bassiana* em contato com o fungicida azoxistrobina a 5 gL^{-1} p.c., incubadas por 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

4.4.2 Produtividade de Conídios

Ao finalizar a pressão de seleção, obteve-se maior produtividade de conídios (PC), para as colônias induzidas do isolado CB 102 (T) ($41,58 \times 10^7$ conídios mL^{-1}) não diferindo estatisticamente da colônia sem indução (SI) (Tabela 3). Para o isolado UNIOESTE 4 (T) observou-se grande redução da produtividade nas primeiras quatro repicagens das colônias induzidas. Entretanto, a partir da quinta repicagem ocorreu um aumento da produtividade de conídios, não diferindo estatisticamente da quinta até a nona repicagem. Mesmo apresentando aumento da produtividade na décima repicagem, ainda não foi suficiente para atingir a produtividade da colônia sem indução.

Para o isolado CG 460 (S) observou-se baixa produtividade de conídios das colônias induzidas nas primeiras cinco repicagens. A partir da sexta repicagem, ocorreu um aumento elevado na sua produtividade, passando de $0,32 \times 10^7$ (5° repicagem) para $19,90 \times 10^7$ conídios mL^{-1} (6° repicagem). Este aumento pode ser resultado de uma mutação, que ocasionou uma provável adaptação ao produto, que pode estar relacionado ao tempo, por diminuir o intervalo (dias) de desenvolvimento do fungo. Nas repicagens seguintes não ocorreu diferença significativa, porém, em todas as repicagens, a produtividade foi inferior a da colônia sem indução.

Já o isolado CB 17 (S) induzido, apresentou, para a produção de conídios, valor bem abaixo ao da colônia não induzida na primeira repicagem, em seguida, observou-se variação da produtividade no decorrer das repicagens. No entanto, na décima repicagem, não se observou diferença estatística quando comparada à colônia SI, mostrando adaptação ao fungicida e ao seu efeito deletério. O mesmo foi observado por Cavalcanti et al. (2004), após pressão de seleção, as colônias selecionadas do isolado de *B. bassiana* UFLA 4 igualaram-se à produtividade da colônia não induzida.

Os isolados CB 39 e CB 84 mesmo mostrando aumento da produtividade com o processo de indução, apresentaram valores bem abaixo dos observados para os tratamentos sem indução. Os conídios podem ser afetados

pelos agrotóxicos até mesmo em condições epizoóticas da doença, reduzindo a eficiência dos isolados (GARDNER; STOREY, 1985), como na esporulação.

Os isolados sensíveis, CG 460, CB 17 e CB 39, apresentaram crescimento vegetativo semelhante na última repicagem (Tabela 2, fig 1). No entanto, a produtividade dos isolados CG 460 ($23,66 \times 10^7$) e CB 17 ($28,31 \times 10^7$) foi superior à do isolado CB 39 (74×10^7 conídios mL^{-1}). Isto mostra haver uma correlação inversa entre tamanho da colônia e produtividade (Tabela 3). Uma hipótese para explicar a adaptação dos isolados ao agente deletério externo, neste caso o fungicida azoxistrobina, pode estar relacionada com algum mecanismo fisiológico de resistência, onde o fungo metaboliza o composto tóxico utilizando-o como nutriente. Outra hipótese pode ser considerada como um esforço reprodutivo do fungo, em contato com o produto tóxico, conseqüentemente aumentando a produção de conídios e assim garantindo a perpetuação da espécie (MOINO Jr. ; ALVES, 1998).

Ao considerarmos a seleção para uso a campo, num sistema onde o produto químico venha a ser utilizado, o isolado CG 460 seria o mais indicado, pois a sua adaptação poderia contribuir para o seu estabelecimento na área, produzindo conídios em grande quantidade e aumentando a probabilidade de ocorrência de infecção dos inseto em epizootias. Considerando que na maioria dos programas de controle biológico com fungos entomopatogênicos utilizam-se aplicações inundativas do patógeno, é inicialmente necessária uma grande quantidade de conídios que são produzidos em meio artificial (ALVES, 1998). Além de que, o meio de cultura é a base inicial do processo de produção de fungos em larga escala que, em etapas posteriores, passam a ser produzidos sobre substratos de menor custo, como por exemplo, o arroz pré-cozido (LEITE et al., 2003). Por esta razão, isolados que mesmo sendo virulentos à praga, não apresentarem bom desenvolvimento sobre meios de cultura, não são recomendados para programas de controle biológico.

Tabela 3 – Produtividade de conídios ($\times 10^7$) em de colônias ($1,76 \text{ cm}^2$) de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* induzidas e não induzidas pelo fungicida azoxistrobina (5 gL^{-1}), incubadas 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

ISOLADOS												
Rep.*	UNIOESTE 4 (T)				CB 102 (T)				CG 460 (S)			
	SI		I		SI		I		SI		I	
1	27,25 ± 4,43**	CBDa	0,84 ± 3,15	Cb	40,87 ± 6,62	Aa	10,18 ± 1,58	Cb	23,37 ± 4,59	Ba	0,12 ± 4,37	Cb
2	14,37 ± 1,92	Da	0,74 ± 9,54	Cb	50,20 ± 8,31	Aa	18,43 ± 4,48	BCb	42,04 ± 15,32	ABa	0,25 ± 3,88	Bb
3	22,29 ± 5,16	CDa	0,97 ± 2,59	Cb	60,50 ± 8,25	Aa	29,93 ± 2,41	ABb	53,45 ± 8,03	ABa	0,32 ± 2,80	Bb
4	55,62 ± 7,27	ABCa	0,95 ± 6,92	Cb	42,45 ± 7,12	Aa	41,53 ± 5,07	ABb	66,12 ± 7,85	Aa	0,21 ± 4,92	BCb
5	28,87 ± 7,35	BCDa	17,62 ± 3,40	Bb	26,25 ± 3,31	Aa	34,75 ± 7,59	Aba	32,16 ± 3,93	ABa	0,32 ± 2,37	Bb
6	18,54 ± 3,64	CDa	15,62 ± 4,37	Ba	25,58 ± 19,17	Aa	25 ± 6,55	Aba	37,08 ± 8,24	ABa	19,90 ± 2,02	Ab
7	19,20 ± 3,96	CDa	16,56 ± 4,35	Ba	36,58 ± 6,57	Aa	17,59 ± 3,94	BCb	62,00 ± 7,24	Aa	20,25 ± 0,36	Ab
8	53,5 ± 6,42	ABa	14,5 ± 0,36	Bb	42,83 ± 6,57	Aa	26,65 ± 4,26	ABb	32,12 ± 5,31	ABa	25,05 ± 9,80	Ab
9	88,5 ± 13,41	Aa	27 ± 7,29	Bb	58,37 ± 10,96	Aa	25,18 ± 2,86	Aba	31,91 ± 6,09	ABa	20,25 ± 1,10	Ab
10	80,7 ± 7,85	ABa	35 ± 0,68	Ab	40,79 ± 6,57	Aa	41,58 ± 1,10	Aa	53,12 ± 6,93	ABa	23,66 ± 1,10	Ab

*Rep.- repicagem; SI- sem indução (controle: sem adição produto); I- indução (fungicida); T- tolerante; S- sensível;

**Médias ($\times 10^7$) (\pm erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Tabela 3 – (Cont.) Produtividade de conídios ($\times 10^7$) em de colônias ($1,76 \text{ cm}^2$) de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* induzidas e não induzidas pelo fungicida azoxistrobina (5 gL^{-1}), incubadas 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

ISOLADOS												
Rep.*	CB 39 (S)				CB17 (S)				CB 84 (S)			
*	SI	I	SI	I	SI	I	SI	I	SI	I	SI	I
1	14,58 ± 3,14**	Aa	1,02 ± 4,88	Db	22,87 ± 6,46	Ba	12,12 ± 2,36	Db	6,96 ± 2,00	Ea	0,13 ± 6,18	Cb
2	36,04 ± 7,90	Aa	2,24 ± 5,44	Cb	32,58 ± 6,99	Ab	25,21 ± 28,73	Ab	13,70 ± 3,22	DEa	0,22 ± 7,48	BCb
3	47,66 ± 9,16	Aa	1,59 ± 1,80	CDb	44,04 ± 11,05	Aa	19,95 ± 3,15	CDb	42,04 ± 8,50	ABCa	0,43 ± 5,47	ABb
4	25,25 ± 5,63	Aa	2,22 ± 4,60	Cb	45,08 ± 9,66	Aa	20,01 ± 13,32	BCb	13,37 ± 2,88	DEa	0,44 ± 13,13	ABb
5	25,37 ± 2,51	Aa	1,91 ± 14,37	CDb	25,66 ± 3,72	Aba	20,16 ± 3,30	BCb	10,54 ± 3,79	DEa	0,45 ± 3,11	ABb
6	29,37 ± 5,81	Aa	2,46 ± 13,51	BCb	25,37 ± 4,92	Aba	17,04 ± 0,52	CDb	0,73 ± 16,56	Aa	0,46 ± 5,24	ABb
7	64,20 ± 3,58	Aa	5,03 ± 14,98	Bb	28,33 ± 5,31	Aba	17,33 ± 13,06	CDb	19,66 ± 4,25	ABCa	0,49 ± 5,60	ABb
8	16,33 ± 2,68	Aa	4,71 ± 4,04	Bb	46,04 ± 9,13	Aa	18,54 ± 1,91	Cb	16,62 ± 2,88	BCDa	0,51 ± 6,60	ABb
9	19,79 ± 5,85	Aa	7,74 ± 4,64	Bb	19,79 ± 5,85	Aba	23,12 ± 15,04	Bb	18,5 ± 4,25	ABCa	0,69 ± 6,60	Ab
10	31,87 ± 10,21	Aa	19,25 ± 11,18	Ab	25,25 ± 0,85	Aba	28,31 ± 1,32	Aa	35,58 ± 17,91	ABa	0,74 ± 2,23	Ab

*Rep.- repicagem; SI- sem indução (controle: sem adição produto); I- indução (fungicida); S- sensível.

* **Médias ($\times 10^7$) (\pm erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.5 VIABILIDADE DOS CONÍDIOS

Os isolados UNIOESTE 4 e CB 102, considerados tolerantes, mantiveram a viabilidade de conídios, não diferindo estatisticamente nas primeiras oito repicagens entre os induzidos e não induzidos. Na nona e décima repicagem as colônias induzidas apresentaram maior viabilidade de conídios que as colônias não induzidas (Tabela 4).

Não foi possível avaliar a germinação para os isolados CB 39 e CB 84, devido à baixa produtividade de conídios. O potencial de ação na seleção artificial aumenta com a variação genética (GAUGLER, 1987; ROUSH, 1990). No entanto, mudanças em estudos *in vitro*, podem ocorrer devido às mutações (TANADA; FUXA, 1987) e nem sempre a seleção beneficia todas as características presentes nos agentes de controle, e em alguns casos pode levar à redução de características benéficas (HOY, 1986). Em alguns estudos observou-se a interferência do produto na viabilidade, como o realizado por Clark et al. (1982) que observaram redução da ação de *B. bassiana* quando associado ao fungicida mancozeb, em condições de campo.

Os isolados sensíveis que apresentaram aumento da viabilidade dos conídios com o processo de indução, foram as colônias induzidas de CG 460 e CB 17. No início do processo de indução apresentavam 39% de germinação aproximadamente, enquanto que ao final do processo, ambos apresentaram viabilidade de conídios superior à testemunha, com 86,43% e 76,75% respectivamente. Cavalcanti et al. (2004) obtiveram, após três repicagens do isolado UFLA-4, em contato com o acaricida fenproprina, uma porcentagem da germinação dos conídios do tratamento com o produto superior ao tratamento testemunha.

Tabela 4 – Germinação de conídios (%) dos isolados de *B. bassiana*, provenientes de colônias com e sem contato com o fungicida azoxistrobina (5 gL^{-1}), incubadas por 22 horas a 25°C e fotófase de 12 horas.

		Germinação de conídios (%)											
Isolados		1º		3º		5º		7º		9º		10º	
UNIOESTE 4 (T)	SI*	68,29 ± 2,10**	Aa	65,26 ± 3,93	Aa	73,36 ± 1,57	Aa	69,31 ± 1,86	Aa	65,26 ± 3,93	Ab	70,13 ± 5,82	Ab
	I	72,83 ± 2,44	ABa	71,28 ± 2,07	ABa	72,40 ± 1,02	ABa	60,76 ± 0,93	Ba	77,03 ± 1,74	Aa	83,96 ± 3,26	Aa
CB 102 (T)	SI	79,75 ± 2,05	Aa	65,58 ± 2,05	Aa	62,53 ± 5,40	Ba	67,26 ± 3,65	Ba	67,26 ± 3,15	ABa	72,22 ± 4,24	ABa
	I	77,07 ± 1,54	Aa	75,07 ± 3,01	ABa	62,09 ± 2,31	Ba	67,55 ± 1,17	ABa	75,17 ± 3,18	ABa	76,65 ± 1,97	Aa
CG 460 (S)	SI	22,83 ± 1,16	Ba	22,83 ± 1,16	Bb	43,01 ± 1,66	Ab	37,69 ± 2,47	Aa	34,96 ± 3,75	Ab	38,46 ± 2,35	Ab
	I	20,08 ± 1,72	Da	32,15 ± 1,86	CDa	53,23 ± 2,51	Ba	42,65 ± 2,35	BCa	42,65 ± 2,35	BCa	86,43 ± 0,93	Aa
CB 17 (S)	SI	32,04 ± 2,01	ABa	32,04 ± 2,01	ABa	37,28 ± 2,75	ABa	18,23 ± 2,17	Bb	26,41 ± 4,69	ABb	39,07 ± 4,53	Ab
	I	33,29 ± 6,62	Ca	33,29 ± 1,34	Ca	48,47 ± 1,47	CBa	61,97 ± 3,12	ABa	60,18 ± 3,07	ABa	76,75 ± 2,42	Aa

*SI- sem indução- controle (sem adição água destilada); I- indução (fungicida); T- tolerante; S- sensível;

**Médias (\pm erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$);

4.4.4 Teste da Virulência

Na virulência a *S. zeamais*, a porcentagem de mortalidade confirmada corrigida, nos diferentes tratamentos, para a maioria das repicagens, com os conídios originados de colônias induzidas, não apresentou diferença estatística em relação às não induzidas (Tabela 5). Somente para o isolado CB 84 (S), os conídios obtidos da décima repicagem, mostraram uma menor virulência do que os obtidos de colônias induzidas em relação às não induzida. Entretanto, este isolado mostrou ser, em todas as avaliações, o menos virulento quando comparado aos demais isolados. Cavalcanti et al. (2004) e Shapiro-Ilan (2002), constataram que todos os isolados tolerantes selecionados aos acaricidas e fungicidas estudados, foram virulentos para insetos-praga, não apresentando resultados diferentes dos tratamentos sem contato com o fungicida e causando elevados níveis de mortalidade.

Cavalcanti et al. (2002) ao testarem produtos fitossanitários quanto à compatibilidade com *B. bassiana*, verificaram que o fungo foi compatível aos produtos inseticidas imidaclopride e tiametoxam, provocando mortalidades confirmadas para lagartas de *Galleria melonella* de 92 e 88%, respectivamente, e não diferiram da testemunha (84%). Também, os conídios produzidos no meio com produtos classificados como não compatíveis, como o iprodiona e fenpropatrina foram virulentos às lagartas. Estes dados mostram que, apesar da toxicidade dos produtos em relação ao crescimento vegetativo e a esporulação, os conídios produzidos podem apresentar capacidade de infectar e matar os insetos nos mesmos níveis dos conídios sem contato com o produto.

Os dados mostram também que o processo de seleção não interferiu na principal característica, a virulência, onde a maioria dos tratamentos não diferiu do controle, ou seja, dos conídios produzidos de colônias sem contato com o fungicida. A única exceção ocorreu com o isolado CB 84, na décima repicagem, que apresentou mortalidade abaixo do controle. Jaros-su et al. (1999) e Mietkiewski et al. (1997) observaram redução da virulência *B. bassiana* a insetos por influência de fungicida.

Os resultados observados neste estudo mostram a necessidade de comparação da virulência, após pressão de seleção do patógeno com o produto fitossanitário, pois em alguns casos, pode ocorrer a redução de características benéficas. Kosir et al. (1991), após indução, analisaram por meio de RFLP do DNA genômico, duas linhagens de *B. bassiana*, selvagem (virulenta) e mutante (menos virulenta). Esta última apresentou um padrão de comprimento de fragmentos de restrição diferente daquele de linhagens mais virulentas. Tais resultados indicaram que as diferenças observadas entre as linhagens incluíram a perda de alguma seqüência de DNA; a qual poderia estar envolvida na virulência.

Tabela 5 – Mortalidade confirmada corrigida (%) de *Sitophilus zeamais* por diferentes isolados de *Beauveria bassiana* de colônias induzidas e não induzidas por contato com o fungicida azoxistrobina (5 gL^{-1}), avaliadas no período de 15 dias e mantidas a 25°C e fotófase de 12 horas.

Mortalidade confirmada corrigida (%)							
ISOLADOS		REPICAGEM					
		1º		5º		10º	
UNIOESTE 4 (T)	SI*	28,80 ± 1,77**	Aa	31,40 ± 3,59	Aa	35,80 ± 7,05	Aa
	I	33,60 ± 5,46	Aa	27,40 ± 6,38	Aa	25,16 ± 4,07	Aa
CB 102 (T)	SI	32,20 ± 2,35	Aa	49,60 ± 8,63	Aa	47,00 ± 3,83	Aa
	I	22,80 ± 1,46	Ba	34,80 ± 5,50	ABa	58,80 ± 8,53	Aa
CG 460 (S)	SI	26,80 ± 4,78	Aa	22,80 ± 5,52	Aa	33,60 ± 6,14	Aa
	I	21,20 ± 1,53	Aa	25,20 ± 2,22	Aa	36,60 ± 6,56	Aa
CB 39 (S)	SI	22,40 ± 1,34	Aba	25,40 ± 1,20	Ba	24,50 ± 1,83	Aa
	I	13,40 ± 3,32	Aba	18,00 ± 0,20	Ba	26,25 ± 0,71	Aa
CB 17 (S)	SI	22,40 ± 3,91	Aa	25,40 ± 2,96	Aa	24,50 ± 1,43	Aa
	I	23,40 ± 0,75	Aa	18,00 ± 2,19	Aa	26,25 ± 2,22	Aa
CB 84 (S)	SI	1,60 ± 0,93	Aba	1,00 ± 0,19	Ba	7,00 ± 2,90	Aa
	I	1,60 ± 0,93	Aa	2,00 ± 0,13	Aa	4,40 ± 2,90	Ab

**Médias (\pm erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$);

*SI- sem indução (controle: sem adição produto); I- indução (fungicida); T- tolerante; S- sensível.

4.4.5 Concentração Mínima Inibitória

Desde a concentração padrão de 5 g L⁻¹ até a dose de 160g L⁻¹ p.c., ocorreu um decréscimo no crescimento vegetativo dos isolados, tolerantes e sensíveis. No entanto, não foi possível estimar a concentração mínima inibitória (CMI), pois em nenhuma das doses, observou-se a redução total da colônia (Figura 2). A utilização de doses acima de 160 g L⁻¹ não foi possível, pois deixaria a solução do fungicida supersaturada, resultando em erro experimental. Em estudo com um fungo fitopatogênico, *Botrytis cinerea*, Caldari Júnior (1998) constatou que, mesmo em altas concentrações, os fungicidas azoxistrobina, folpet, dithianon, quintozene e dimethomorph não inibiram o crescimento das colônias, não apresentando efeito tóxico. Zou et al. (2006) observaram alta dose de CMI com o isolado de *B. bassiana* 2860 (CMI 1,32 µg mL⁻¹), sensível aos fungicidas benomil e tiofanato metílico e que adquiriu resistência após repicagens seqüenciais onde as colônias com indução apresentaram CMI superior a 1000 µg mL⁻¹.

Houve efeito significativo ($P < 0,01$) da interação entre dose e crescimento vegetativo (CV) quanto ao efeito do tamanho da colônia. Assim, ocorreu redução do tamanho da colônia com o aumento da dose do fungicida azoxistrobina. As maiores reduções no CV foram observadas para os isolados CG 460, CB 39, CB 17 e CB 84 nas colônias induzidas. O coeficiente de determinação apresentou 92,86; 98,47; 96,42 e 92,53% de ajuste respectivamente, em relação à área observada (Tabela 6).

Ao comparar o CV quanto à análise de variância de médias, para os isolados sensíveis CG 460, CB 17, CB 39 e CB 84, das colônias induzidas e não induzidas, no tratamento sem adição de produto (controle), a colônia induzida apresentou maior desenvolvimento. Porém, para os demais tratamentos, tanto para os isolados tolerantes como para os sensíveis, não houve diferença estatística entre as colônias induzidas e não induzidas, dentro da mesma concentração (Tabela 7). Esta baixa sensibilidade a determinadas estrobilurinas, também já foi constatada para outras espécies de fungos e pode estar relacionada, à indução da respiração alternativa que catalisa a transferência de elétrons para o oxigênio (ZIOGAS et al.,

1997; OLAYA; KÖLLER, 1999; YPEMA; GOLD, 1999). Essa rota alternativa é utilizada por fungos que crescem em meios à base de ágar, especialmente aqueles ricos em nutrientes (REUVENI; SHELGOV, 2002).

Na variável produtividade de conídios os isolados tolerantes não apresentaram diferença estatística entre as colônias estudadas com e sem indução, quando em contato com o produto na maior dosagem. Já os isolados sensíveis, CB 84 e CB 39 quando induzidos, apresentaram baixa produtividade em comparação às colônias de isolados não induzidos (Tabela 8). Esta característica também foi observada para o fungo do eucalipto, *Cylindrocladium candelabrum*, em que o fungicida azoxistrobina não reduziu o crescimento vegetativo, porém, foi eficiente na redução da esporulação (LEINHOS et al., 1997; ANESIADIS et al., 2003). Características benéficas nos agentes de controle biológico podem ser perdidas ou reduzidas quando é removida a pressão de seleção (HOY, 1986; SHAPIRO et al., 1996).

O teste para medir a CMI, é um indicador para verificar se a seleção feita foi promovida por uma mutação genética ou apenas uma adaptação fisiológica. Os isolados sensíveis, CG 460 e CB 17, demonstraram que na maior dose testada, 160g L⁻¹, apresentaram diferença estatística para a produtividade de conídios, com maior produtividade nas colônias induzidas. Estes resultados podem indicar que as colônias sob indução sofreram uma mutação ou que, através de uma característica fisiológica já presente, puderam metabolizar o fungicida e ainda utilizar os metabólitos resultantes, liberados no meio de cultura, como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento e a produção de conídios. Também com relação à maior produtividade de conídios das colônias sob indução, existe a possibilidade de que o fungo utilize todo o seu esforço reprodutivo quando na presença de um produto tóxico e assim, altere resposta com maior crescimento vegetativo e produção de conídios (ALVES et al., 1998; BATISTA FILHO et al., 2001; MOINO Jr.; ALVES, 1998).

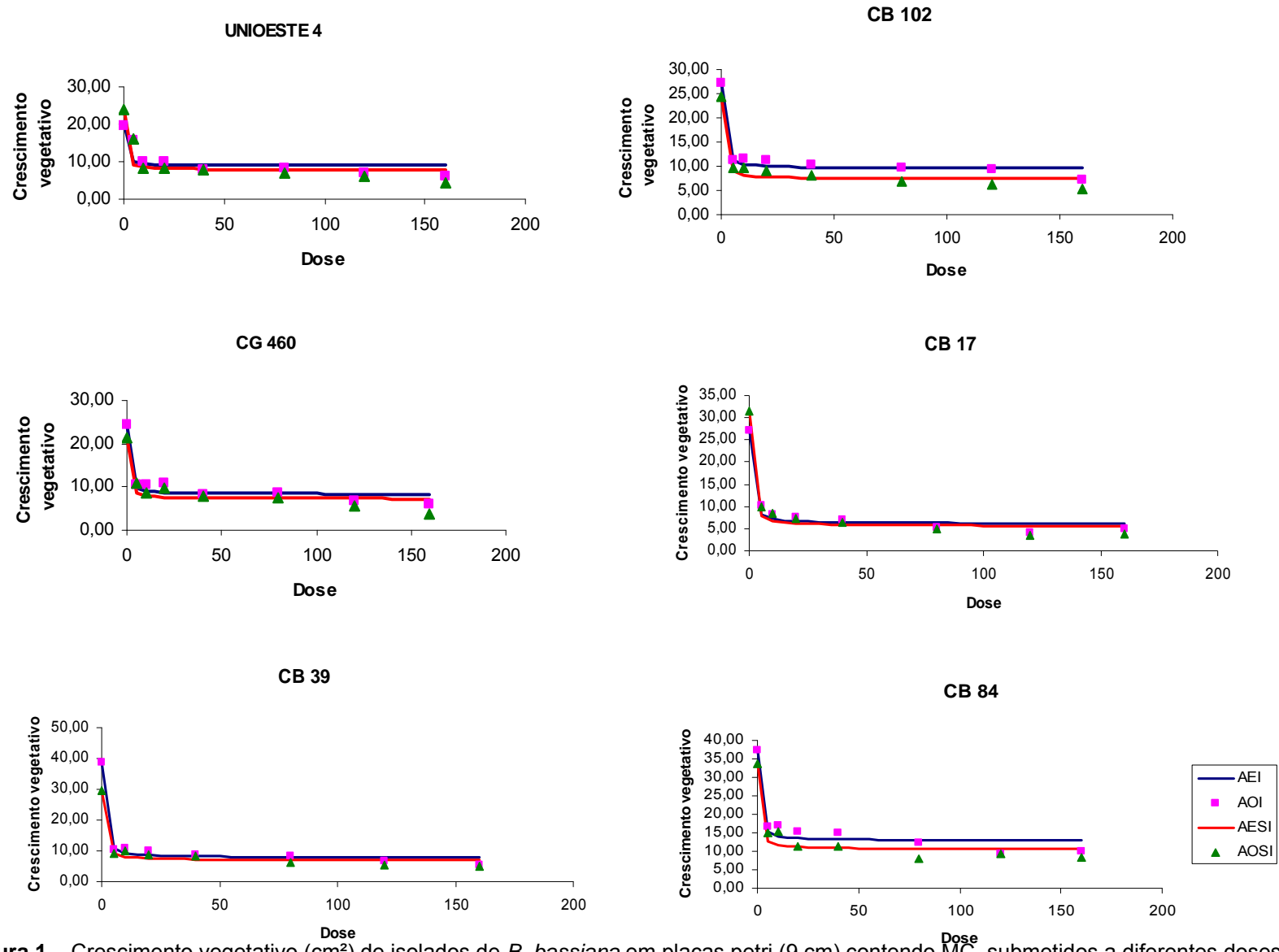


Figura 1 – Crescimento vegetativo (cm²) de isolados de *B. bassiana* em placas petri (9 cm) contendo MC, submetidos a diferentes doses do fungicida azoxistrobina. AEI- área estimada indução; AOI- área observada indução; AESI- área estimada sem indução; AOSI- área observada sem indução.

Tabela 6 – Estimativa da regressão linear inversa, que correlaciona a dose do produto azoxistrobina com o crescimento vegetativo (cm²) das colônias induzidas e não induzidas, dos isolados de *B. bassiana*.

Isolados		Parâmetros		
		Intersecção (a)	Inclinação (b)	r ² *
UNIOESTE 4 (T)** ¹	SI**	7,822592	8,267550	78,14%
	I	8,905787	5,671427	68,91%
CB 102 (T)	SI	9,584774	8,916365	96,64%
	I	7,389900	8,542996	95,30%
CG 460 (S)	SI	7,261227	7,144897	87,29%
	I	8,361198	8,012861	92,86%
CB 17 (S)	SI	5,552673	13,049653	97,33%
	I	6,152493	10,568639	96,42%
CB 39 (S) ¹	SI	6,990199	11,341874	97,08%
	I	7,829552	15,397362	98,47%
CB 84 (S) ¹	SI	10,596194	11,740911	93,15%
	I	12,954066	12,285056	92,53%

* r²- coeficiente de determinação do modelo $y=a+b(1(x-0,5)^{-1})$

** SI- sem indução (controle: sem adição produto); I- indução (fungicida); T- tolerante; S- sensível;

¹ Regressão significativa (P<0,01)

Tabela 7 – Área média de crescimento vegetativo (cm²) das colônias dos isolados de *Beauveria bassiana* em placas contendo MC com diferentes doses do fungicida azoxistrobina, incubados por 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

ISOLADOS												
Conc. Prod.*	UNIOSTE 4 (T)				CB 102 (T)				CG 460 (S)			
	SI		I		SI		I		SI		I	
0	23,76 ± 0,50**	Aa	19,72 ± 1,81	Ab	24,31 ± 4,22	Aa	27,34 ± 0,47	Aa	21,29 ± 3,73	Aa	24,20 ± 0,67	Aa
5	16,26 ± 0,10	Ba	15,69 ± 0,71	Ba	9,77 ± 1,00	Ba	11,12 ± 1,94	Ba	10,76 ± 0,34	Ba	10,65 ± 1,35	Ba
10	8,30 ± 0,23	Ca	9,93 ± 0,73	Ca	9,67 ± 0,95	Ba	11,63 ± 2,00	Ba	8,55 ± 0,15	Ba	10,66 ± 0,35	Ba
20	8,47 ± 0,37	Ca	10,07 ± 1,28	Ca	9,19 ± 0,70	Ba	11,14 ± 0,10	Ba	9,72 ± 0,24	BCa	10,85 ± 0,19	Ba
40	7,64 ± 0,46	CDa	7,88 ± 0,34	CDa	8,15 ± 0,66	Ba	10,37 ± 0,35	Ba	7,80 ± 0,29	BCa	8,43 ± 0,89	Ba
80	7,13 ± 0,97	CDa	8,42 ± 0,82	CDa	6,92 ± 0,41	Ba	9,62 ± 0,28	Ba	7,42 ± 0,65	BCa	8,51 ± 0,90	Ba
120	6,19 ± 0,66	CDa	7,08 ± 0,41	CDa	6,24 ± 0,26	Ba	9,49 ± 0,99	Ba	5,80 ± 0,19	BCa	6,61 ± 0,10	Ba
160	4,47 ± 0,23	Da	5,94 ± 6,61	Da	5,18 ± 0,18	Ba	7,15 ± 6,61	Ba	3,75 ± 0,87	Ca	6,02 ± 6,61	Ba

*Conc. Prod. – concentração do produto (g L⁻¹); SI- sem indução (controle: sem adição produto); I- indução (fungicida); T- tolerante; S- sensível.

**Médias (± erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Tabela 7 – (Cont.) Área média de crescimento vegetativo (cm²) das colônias dos isolados de *Beauveria bassiana* em placas contendo MC com diferentes doses do fungicida azoxistrobina, incubados por 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

ISOLADOS												
Conc.	CB 17 (S)				CB 39 (S)				CB 84 (S)			
Prod.*	SI	I	SI	I	SI	I	SI	I	SI	I	SI	I
0	31,39 ± 3,60**	Ab	27,05 ± 1,00	Aa	29,54 ± 0,16	Ab	38,55 ± 2,25	Aa	33,71 ± 0,89	Ab	37,21 ± 0,18	Aa
5	9,81 ± 0,24	Ba	10,09 ± 0,34	Ba	9,30 ± 0,85	Ba	10,27 ± 0,19	Ba	15,10 ± 0,42	Ba	16,74 ± 0,12	Ba
10	8,39 ± 0,45	BCa	8,14 ± 0,47	BCa	9,81 ± 0,19	Ba	10,95 ± 0,42	Ba	15,45 ± 0,62	Ba	17,11 ± 0,32	Ba
20	7,23 ± 0,08	BCDa	7,65 ± 0,53	BCa	8,90 ± 0,09	BCa	10,00 ± 0,33	Ba	11,31 ± 1,29	Cb	15,21 ± 0,35	BCa
40	6,31 ± 0,27	BCDa	7,12 ± 0,82	BCa	8,39 ± 0,31	BCDa	8,73 ± 0,09	BCa	11,25 ± 0,36	Cb	14,87 ± 0,34	BCa
80	4,85 ± 0,13	CDa	5,18 ± 0,13	Ca	6,25 ± 0,51	CDEb	8,39 ± 0,31	BCDa	8,05 ± 0,25	CDb	12,46 ± 0,28	CDa
120	3,54 ± 0,40	CDa	4,06 ± 0,47	Ca	5,53 ± 0,36	Dea	6,85 ± 0,40	CDa	9,45 ± 0,37	Ea	9,34 ± 1,31	DEa
160	3,93 ± 0,31	Da	5,06 ± 6,61	Ca	5,18 ± 0,13	Ea	5,52 ± 6,61	Da	8,39 ± 0,42	Ea	9,90 ± 6,61	Ea

*Conc. Prod. – concentração do produto (g L⁻¹); SI- sem indução (controle: sem adição produto); I- indução (fungicida); S-sensível.

**Médias (± erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada isolado, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Tabela 8 – Produtividade de conídios ($\times 10^7$) em de colônias ($1,76 \text{ cm}^2$) de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* induzidas e não induzidas pelo fungicida azoxistrobina, incubadas 15 dias a 25°C e fotófase de 12 horas.

ISOLADOS	Controle (Trat. 1)			160 g L ⁻¹ (Trat. 2)				
	I	SI		I	SI			
UNIOESTE 4 (T)	350,62 ± 1,38**	Aa	280,875 ± 2,85	Bb	53,5 ± 0,99	Ca	57,87 ± 0,93	Ca
CB 102 (T)	298,75 ± 0,87	Bb	460,41 ± 0,25	Aa	93,25 ± 1,71	Ca	98,08 ± 3,07	Ca
CG 460 (S)	332,91 ± 3,16	Bb	370,83 ± 7,12	Aa	93,5 ± 0,96	Ca	53,125 ± 1,29	Db
CB 17 (S)	228,75 ± 7,29	Ab	256,66 ± 5,12	Aa	46,04 ± 2,54	Cb	71,58 ± 1,61	Ba
CB 84 (S)	185,01 ± 2,15	Ab	196,66 ± 2,95	Aa	16,65 ± 0,64	Ba	15,20 ± 0,72	Ba
CB 39 (S)	197,91 ± 2,54	Aa	213,33 ± 5,86	Aa	17,04 ± 0,88	Bb	25,25 ± 2,00	Ba

**Médias (\pm erro padrão) seguidas da mesma letra maiúscula na linha, para cada isolado e de mesma letra minúscula na linha, para cada tratamento não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 0,05$;

*SI- sem indução (controle: sem adição produto); I- indução (fungicida); T- tolerante; S- sensível; Trat- tratamento

4.4.6 Comparação por RAPD dos perfis de colônias com e sem indução

No presente trabalho, foram avaliados inicialmente duas colônias do isolado CB 17, uma colônia induzida pelo fungicida azoxistrobina e outra sem indução. Foram avaliados os perfis de RAPD deste isolado utilizando dez iniciadores (OPE 7, OPE 14, OPE 16, OPAM 4, OPAM 10, OPAM 13, OPAM 14, OPAM 16, OPAM 18, OPAM 20)

A colônia submetida à indução da resistência apresentou produtividade de conídios superior à colônia sem indução. Apesar das diferenças encontradas na produtividade de conídios e na concentração mínima inibitória a composição genética da maioria dos locos foi preservada. Dentre os 77 marcadores analisados, 76 (98,7%) estiveram igualmente presentes nas colônias induzida e não induzida. Apenas um marcador, obtido com o primer OPE-7, esteve presente na colônia induzida e ausente na colônia não induzida.

Há relatos de resistência de fungos ao ingrediente ativo azoxistrobina, como a detectada inicialmente em *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (Di RAGO et al., 1995) e confirmados também para *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* Marchal e *Pseudocercospora cubensis* Berk em cultivos de trigo e cucurbitáceas, respectivamente (SIEROTSKI et al., 2000; ISHII et al., 2001). Também, após realizar testes de sensibilidade de isolados de *Alternaria solani* (Ellis e G. Martin) constatou-se ter havido redução de sensibilidade a azoxistrobina, em relação aos isolados obtidos de áreas de cultivo onde não se havia aplicado o produto (MIZUBUTI, 2007).

Uma das hipóteses para explicar a alteração da sensibilidade de fungos a fungicidas inibidores da respiração mitocondrial (estrobirulina-azoxistrobina) é atribuída a uma mutação no gene do citocromo b (GENIX; VILLIER, 2003; NEUBURGER et al., 2003; FRAC, 2005). Investigações posteriores mostram que os fenótipos resistentes encontram-se estreitamente associados com a substituição do aminoácido guanina por citosina no códon 143 (GGT) que codifica para o aminoácido glicina da proteína citocromo b (SIEROTZKI et al., 2000; ZHENG et al., 2000; ISHII et al., 2001; SIRVEN; BEFFA, 2003).

Neste estudo, o perfil obtido por RAPD mostrou que não houve expressiva alteração genética do isolado, quando submetido à pressão do fungicida nas sucessivas repicagens. Para identificar a causa da resistência do isolado CB 17

de *B. bassiana* ao fungicida azoxistrobina, são necessários estudos complementares.

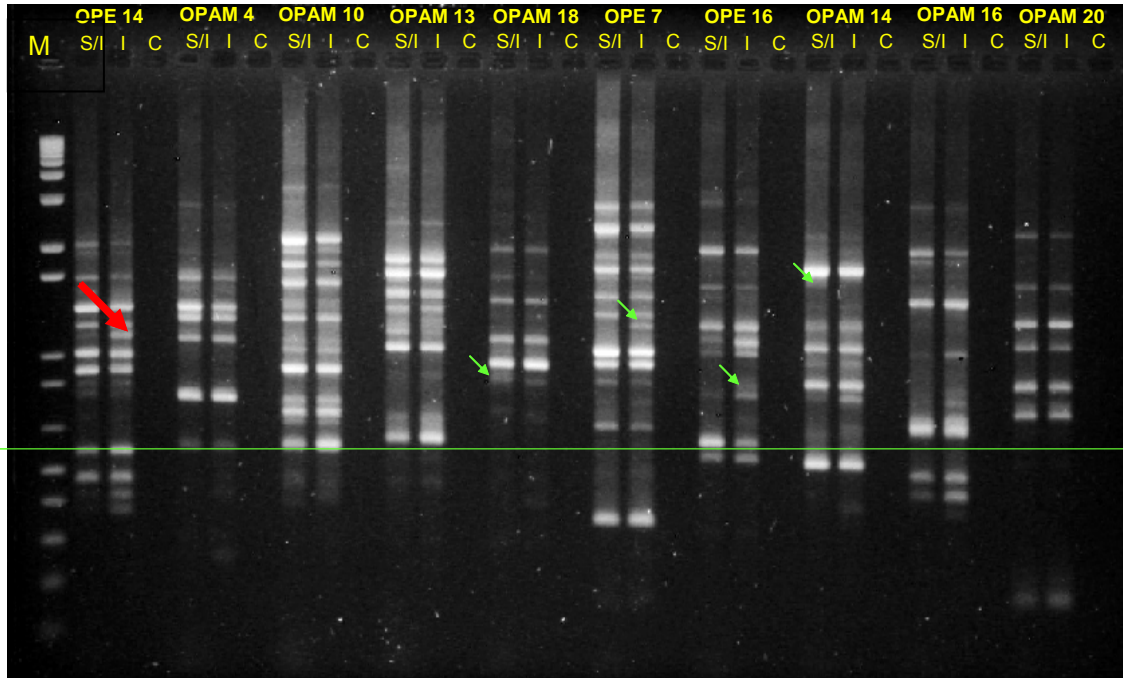


Figura 3 – Perfil eletroforético obtido a partir da comparação de colônia induzida e não induzida do isolado CB 17 de *Beauveria bassiana*.

M - Marcador de Peso Molecular; C - Controle negativo; SI – sem indução, I - induzido

4.5 CONCLUSÕES

- Isolados de *Beauveria bassiana* considerados naturalmente tolerantes ao fungicida azoxistrobina não sofrem interferência no seu desenvolvimento após a indução da resistência;
- O processo de indução de resistência ao fungicida azoxistrobina, aumenta o crescimento vegetativo a produtividade de conídios e a viabilidade dos isolados sensíveis de *B. bassiana*;
- Após a indução da resistência observa-se alteração no perfil eletroforético na comparação das colônias induzidas e não induzidas do isolado CB 17.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, FEALQ, p. 289-381, 1998.

ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M.; Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, cap 8, 217-218. 1998,

ANESIADIS, T., KAROAGLANIDIS, G.S.; TZAVELLA-KLONARI, K. Protective, curative and eradicant activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. **Journal of Phytopathology** 151:647-651. 2003.

AZEVEDO, A.C.S.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMES, D.R.; FUNGARO, M.H.P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**. v.57, p.729-732, 2000

AZEVEDO, L.A.S.; OLIVEIRA, S.H.F. Utilização de fungicidas protetores no manejo da resistência de fungos. **Boletim Técnico** 1. 2003.

BARBIN, D. Planejamento e análise estatística de experimentos agronômicos. **Arapongas: Midas**, 2003. 208p.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**. 30: 437-447. 2001.

BRENT, K.J .; HOLLomon, D. J. Fungicide resistance: the assessment of risk. **Brussels: Global Crop Protection Federation**, 48. 1998.

CALDARI JÚNIOR, P. Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais. 51 f. **Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)** – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998.

CAVALCANTI, R.S., MOINO JR, A., SOUZA, G.C.; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos Instituto Biológico**. 69:17-22. 2002.

CAVALCANTI, S.C.; MOINO JR, A.; SOUZA, G.C.; DUARTE, A.M. Seleção de colônias de *Beauveria bassiana* resistentes a produtos fitossanitários. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**. 71: 21-27. 2004.

CLARK, R.A., CASAGRANDE, R.A., WALLACE, D.B. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. **Environmental Entomology**. 11, 67–70. 1982.

DELEN, N.; TOSUN, N. Fungicidas: mecanismos de ação e resistência. Parte 1: Fungicidas com mecanismos de ação não-específica. *In*: LUZ, W. C. (Ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas. 43-69. 2003.

DI RAGO, J.P.; HERMANN-LE, J.S.; PAQUES, F.; RISLER, J.; NETTER, P.; SLONIMSKI, P.P. Genetic analysis of the folded structure of yeast mitochondrial cytochrome b by selection of intragenic second-site revertants. **Journal Molecular Biology**. 248, 804-811. 1995.

FRAC. FRAC fungicide group names and codes. Complex III of fungal respiration: ubiquinol oxidase, Qo site. En: [http:// www.frac.info](http://www.frac.info); consulta: agosto 2005. **FRAC**. Mutations associated with QoI-resistance (Updated 11- Oct-2005) En: <http://www.frac.info>; consulta: marzo de 2005.

FRAAIJE, B.A.; BUTTERS, J.A.; COELHO, J.M.; JONES, D.R.; HOLLomon, D.W. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific realtime PCR measurements with the fluorescent dye SYBR green I. **Plant Pathology**. 51, 45–54. 2002.

GARDNER, W.A.; STOREY, G.K. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.78, n.6, p.1275-1279, 1985.

GAUGLER, R. Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvement. Pp. 457-484 *in* K. Maramorosch, ed. Biotechnological advances in invertebrate pathology and cell culture. New York: **Academic Press**. 1987.

GENIX, P.; VILLIER, A. Fenamidone inhibits mitochondrial respiration, a property not shared by its metabolites. **Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer** 56, 444-448. 2003.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de Fungos a Fungicidas. **EMBRAPA-FRAC**, Jaguariúna-SP. 2000.

GISI, U.; CHIN, K. M.; KNAPOVA, G.; KUNG FARBER, R.; MOHR, U.; PARISI, S.; SIEROTZKI; STEINFELD, U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, dmi and strobilurin fungicides. **Crop Protection**, v. 19, p. 863-872, 2000.

HOY, M.A. Use of genetic improvement in biological control. **Agriculture Ecosystems Environmental**. 15, 109–119. 1986.

ISHII H, FRAAIJE B A, SUGIYAMA T, NOGUCHI K, NISHIMURA K, TAKEDA T, AMANO T, HOLLOMON D W. Occurrence and molecular characteristics of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. **Phytopathology**. 91, 1166-1171. 2001.

JARUS-SU, J.; GRODEN, E.; ZHANG, J. Effects of selected fungicides application on *Beauveria bassiana* induced mortality of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Crysmelidae). **Biological Control**, San Diego, 15 (3): 259-269. 1999.

KOSIR JM; MACPHERSON JM; KHACHATOURIANS GG. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. **Canadian Journal Microbiology**. 37:534–541. 1991.

LEINHOS, G.M.E., GOLD, R.E. DÜGGELIN, M.; GUGGENHEIM, R. Development and morphology of *Uncinula necator* following treatment with the fungicides Kresoxim-methyl and penconazole. **Mycology Research**. 101:1033-1046. 1997.

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

LOUREIRO, E.S. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com outros produtos fitossanitários e sua interação com *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera, Aphididae) e *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera, Anthocoridae). 2001, 121f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; AZEVEDO, J.L. Characterization of benomyl resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. **Revista Brasileira de Genética**. 12(3): 477-484. 1989.

MCGRATH M T; SHISHKOFF N. Resistance to strobilurin fungicides in *Podosphaera xanthii* associated with reduced control of cucurbit powdery mildew in a research field. **Phytopathology**. 93: 59. 2003.

MEIRELLES, L.D.P.; BOAS, AM.V.; AZEVEDO, J.L. Obtention and evaluation of pathogenicity of ultra violet resistant mutants in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Revista de Microbiologia**. 28 (2): n121-124.

MIĘTKIEWSKI, R.T., PELL K.J., CLARK S.J. Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soil in the UK: field and laboratory comparisons. **Biocontrol Science Technology**. 7: 565575. 1997.

MOINO Jr, A; ALVES, S.B. Determinação de concentrações de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de insetos-pragas de grãos armazenados. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 26, p. 15-20, 1997.

NEVES, P. M. O. J., HIROSE, E. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* Para o Controle Biológico da Broca-do-Café *Hypothenemus Hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.77 - 88, 2005.

NEUBURGER, M.; BEFFA, R.; VILLIER, A. Mode of action of fenamidone: similarities and differences with known QoI. **Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer** 56, 449-464. 2003.

OLAYA, G.; KÖLLER, W. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to strobilurin fungicide kresoxim-methyl. **Plant disease**. 83(3): 274-278. 1999.

POMBEIRO, S.R.C.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Genetic study of a triadimefon-resistant mutant of *Aspergillus nidulans*. **Revista Brasileira de Genética**. 13(4): 653-660. 1990.

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

POTRICH, M.; ALVES, L.F.A.; MERTZ, N.R.; SILVA, E.R.L. Avaliação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Bioassay**. 1: 12. 2006.

RAPOSO, R.; COLGAN, R.; DELCAN, J.; MELGAREJO, P. Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Brotrytis cinerea*. **Plant disease**. 79 (3): 294-296. 1995.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. **Crop Protection**. 21:951-955. 2002.

ROBERTSON, J.L., SMITH, C.K., SAVIN, N.E., LAVIGNE, R.J. Effect of dose selection and sample size on the precision lethal dose estimates in dose-mortality regression. **Journal Economic Entomology**. 77, 833–837. 1984.

ROHLF. Geometric morphometrics in systematics. Published as a chapter in N. Macleod and P. Forey (eds.) **Morphology, shape and phylogenetics**. Taylor&Francis: London.2002.

ROUSH, R. T. Genetics considerations in the propagations of entomophagous species. In: LISS, A. R. (ed.). New directions in biological control: alternatives or suppressing agricultural pests and diseases. **New York: Chapman and Hall**, 373-387. 1990.

SHAPIRO, D.I., GLAZER, I., SEGAL, D. Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain. **Biological Control**. 6, 238–244. 1996

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

SIEROTZKI, H.; WULLSCHLEGER, J.; GISI, U. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field Isolates. **Pesticide Biochemical and Physiology**. 68, 107-112. 2000.

SIRVEN, C.; BEFFA, R. Resistance to Fenamidone: Monitoring by real-time quantitative PCR on *Plasmopara viticola*. **Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer** 56, 523-532. 2003.

TANADA, Y., FUXA, J.R., The pathogen population. In: Fuxa, J.R., Tanada, Y. (Eds.), Epizootiology of Insect Diseases. **Wiley, New York**. 113–157. 1987.

YPEMA, H. L.; GOLD, R. E. Kresoxim-methyl: Modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. **Plant Disease**. 83:4-19. 1999.

ZHENG D, OLAYA G, KOLLER W. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin related fungicide kresoxim-methyl. **Current Genetics** 38, 148-155. 2000.

ZIMMERMANN, G. Über die wirkung systemischer fungizide auf verschiedene insektenpathogene fungi imperfecti *in vitro*. **Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst**. 27: 113-117. 1975.

ZIOGAS, B.N., BALDWIN, B.C.; YOUNG, J.A. Alternative respiration: a biochemical mechanism to azoxystrobin (icia 5504) in *Septoria tritici*. **Pesticide Science**. 50:28-34. 1997.

ZOU, G.; YING, S.H.; SHEN, Z.C.; FENG, M.G.; Multi-sited mutations of beta-butulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agente *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**. 8(12) 2096-2105. 2006.