CONTROLE MICROBIANO DO GORGULHO DA CANA-DE-AÇÚCAR
Sphenophorus levis VAURIE, 1978 (COL.: CURCULIONIDAE)
COM *Beauveria* spp. E *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, 1883

FRANCISCO BADILLA FERNÁNDEZ
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Entomologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1989

CONTROLE MICROBIANO DO GORGULHO DA CANA-DE-AÇÚCAR
Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (COL.: CURCULIONIDAE)
COM *Beauveria* spp. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883

Francisco Badilla Fernández

Aprovado em: 05.09.1989

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

ESALQ/USP

Dr. Newton Macedo

PLANALSUCAR/Araras

Dr. Enrico de Beni Arrigoni

COPERSUCAR/Piracicaba

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves
Orientador

Ao sacrifício e abnegação
da minha mãe, pelo amor
que eu lhe professo (in memoriam)

Ao meu pai, meus irmãos
e à minha avó.

OFEREÇO E DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À "Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas e Tecnológicas (CONICIT)" na Costa Rica, e à Coordenadoria para o Aperfeiçoamento da Pesquisa a Nível Superior (CAPES) do Brasil, pela liberação e auxílio financeiro para realizar o curso de pós-graduação.

Ao Dr. Sérgio Batista Alves, Professor Associado do Departamento de Entomologia, pela orientação e ajuda na elaboração deste trabalho e pelo estímulo, conhecimentos e amizade.

Aos professores do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, especialmente aos Doutores Roberto Antonio Zucchi e José Roberto Postalí Parra, pelos ensinamentos e amizade oferecidos em todo momento.

À Dra. Marinéia de Lara Haddad pela ajuda no planejamento deste trabalho e na análise estatística dos dados obtidos.

Ao Dr. Jerry Stimac da Universidade da Flórida pela elaboração do Summary.

À Dra. Vânia Pires Ferreira pela sua colaboração nos trabalhos de laboratório.

Aos funcionários do Setor de Entomologia do Centro de Tecnologia Copersucar, e Usina Santa Helena, MSc. Atílio Precetti, Dr. Enrico De Beni Arrigoni, técnicos agrícolas Antonio Carlos e Benedito C. Henrique, assim como aos trabalhadores de campo, especialmente a José Pires da Silva e Benedito Bachega pelo apoio e recursos necessários para os trabalhos de campo.

Aos colegas de curso Pedro, Daniel, Enrique Castiglioni, Ana Maria e Marilene, pela amizade, colaboração e estímulos recebidos.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, em especial Solange, pela colaboração e amizade.

A meus familiares o agradecimento profundo e sincero pela sua confiança, apoio moral e espiritual que sempre me brindaram.

A todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xvii
RESUMO	xxi
SUMMARY	xxiii
RESUMEN	xxv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Gorgulho da cana-de-açúcar <i>Sphenophorus levis</i> Vaurie, 1978	03
2.2. Emprego de <i>Beauveria</i> spp. e <i>Metarhizium anisopliae</i> no controle de pragas	06
2.3. Dosagens utilizadas de <i>Beauveria</i> spp. e <i>Metarhizium anisopliae</i> no controle de pragas	08
2.4. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos	14
2.5. Uso de iscas com fungos entomopatogênicos no controle de insetos	15
2.6. Persistência de <i>Beauveria</i> spp. e <i>Metarhizium anisopliae</i> em diversos substratos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material	20
3.1.1. Inseto utilizado na pesquisa	20
3.1.2. Patógenos estudados	20
3.1.3. Meios de cultura	22
3.1.4. Equipamentos	23
3.1.5. Outros materiais	23
3.2. Métodos	24
3.2.1. Manutenção de <i>Sphenophorus levis</i> em laboratório	24
3.2.2. Produção de inóculo	24

3.2.3. Experimentos de laboratório	26
3.2.3.1. Determinação do tempo letal médio, porcentagem de morta- lidade de <i>Sphenophorus le-</i> vis com <i>Beauveria bassia-</i> na isolado 447, em diferen- tes dosagens,.....	26
3.2.3.2. Avaliação da viabilidade dos conídios de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> isolado 447	29
3.2.3.3. Potencial de inóculo de <i>Beauveria bassiana</i> isolado 447,.....	29
3.2.3.4. Patogenicidade de isolados de <i>Beauveria</i> spp. ao gorgu- lho <i>Sphenophorus levís</i> ...	30
3.2.3.5. Produção de conídios pelos cadáveres de <i>Sphenophorus</i> <i>levís</i>,.....	30
3.2.3.6. Determinação da Taxa de Po- tência e análise de agru- pamentos,.....	31
3.2.3.7. Eficiência de <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> sobre os adul- tos de <i>Sphenophorus levís</i> .	31
3.2.3.8. Patogenicidade do <i>Metarhi-</i> <i>zium anisopliae</i> e <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> sobre os adultos de <i>Sphenophorus levís</i> quan- do inoculados em seções de colmo de cana-de-açúcar usa- dos como isca,.....	33

3.2.3.9. Sobrevivência de ovos de <i>Sphenophorus levis</i> quando colocados em iscas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> ..	34
3.2.4. Experimentos de campo	35
3.2.4.1. Eficiência de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado 259 sobre adultos do <i>Sphenophorus levis</i> quando aplicado em iscas de cana-de-açúcar	35
3.2.4.2. Patogenicidade do <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado 259 e <i>Beauveria bassiana</i> isolado 447 sobre os adultos de <i>Sphenophorus levis</i> quando aplicados em iscas de cana-de-açúcar	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Ensaaios de laboratório	43
4.1.1. Patogenicidade de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. isolado 447 sobre adultos de <i>Sphenophorus levis</i> Vaurie, em diferentes dosagens	43
4.1.1.1. Determinação do potencial de inóculo	43
4.1.1.2. Patogenicidade	44
4.1.1.3. Determinação da dose letal média (DL ₅₀) e dos tempos letais médios (TL ₅₀)	47
4.1.2. Patogenicidade dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. sobre adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	49

4.1.2.1. Determinação do potencial de inóculo	49
4.1.2.2. Eficiência dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. sobre adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	50
4.1.2.3. Determinação dos tempos letais médios e Taxa de Potência	53
4.1.2.4. Produção de conídios em cadáveres de adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	56
4.1.3. Patogenicidade de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> para adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	59
4.1.3.1. Determinação do potencial de inóculo	59
4.1.3.2. Eficiência dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre adultos de <i>Sphenophorus levis</i> .	60
4.1.3.3. Determinação dos tempos letais médios e Taxa de Potência de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Sphenophorus levis</i>	63
4.1.3.4. Produção de conídios pelos cadáveres de adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	65
4.1.4. Inoculação do <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> em pedaços de cana-de-açúcar usados como iscas	69
4.1.4.1. Eficiência dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	69

4.1.4.2. Determinação dos tempos letais médios e Taxa de Potência	74
4.1.4.3. Produção de conídios pelos cadáveres de adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	76
4.1.4.4. Sobrevivência de ovos de <i>Sphenophorus levis</i> quando ovipositados em iscas de cana-de-açúcar	79
4.2. Experimentos de campo	81
4.2.1. Eficiência de iscas tratadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado 259 sobre adultos de <i>Sphenophorus levis</i> ..	81
4.2.2. Números de adultos capturados por isca	87
4.2.3. Patogenicidade do <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado 259 e <i>Beauveria bassiana</i> isolado 447 sobre adultos de <i>Sphenophorus levis</i> , quando aplicados em iscas de cana-de-açúcar	95
5. CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Relação dos isolados de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , respectivas procedências, hospedeiros originais e datas de coleta	21
02	Relação dos isolados de <i>Beauveria</i> spp., relativas procedências, hospedeiros originais e datas de coleta	21
03	Número de conídios de <i>B. bassiana</i> isolado 447, que efetivamente permaneceram sobre o tegumento dos adultos de <i>S. levis</i> .	43
04	Porcentagem de mortalidade acumulada de adultos de <i>S. levis</i> causada por <i>B. bassiana</i> isolado 447, após 13 dias da inoculação. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	45
05	Tempos letais (TL ₅₀) e intervalos de confiança (IC) obtidos pelo tratamento de adultos de <i>S. levis</i> com o fungo <i>B. bassiana</i> isolado 447. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP ...	48
06	Número de conídios de sete isolados de <i>Beauveria</i> spp., aplicados na dosagem de 8×10^{11} conídios/balão, que efetivamente permaneceram sobre o tegumento dos adultos de <i>S. levis</i>	49

TABELA Nº

Página

07	Porcentagem de mortalidade acumulada de adultos de <i>S. levis</i> causada pelos isolados de <i>Beauveria</i> spp. após 17 dias. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	51
08	Análise de variância da mortalidade de adultos, machos e fêmeas, de <i>S. levis</i> por <i>Beauveria</i> spp. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	51
09	Médias das porcentagens de mortalidade de, machos e fêmeas de <i>S. levis</i> inoculados com <i>Beauveria</i> spp.	52
10	Tempos letais e taxas de potência resultantes da inoculação de adultos de <i>S. levis</i> por <i>Beauveria</i> spp. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	54
11	Produção média de conídios de sete isolados de <i>Beauveria</i> spp. em adultos de <i>S. levis</i> após 15 dias da inoculação. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	57
12	Número de conídios de sete isolados de <i>M. anisopliae</i> , aplicados na dosagem de 8×10^{11} conídios/balão, que efetivamente permaneceram sobre o tegumento dos adultos de <i>S. levis</i>	60

TABELA Nº

Página

13	Porcentagem de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> causados pelos isolados de <i>M. anisopliae</i> após 22 dias. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	61
14	Análise de variância da mortalidade de machos e fêmeas de <i>S. levis</i> provocada pelos isolados de <i>M. anisopliae</i>	61
15	Médias das porcentagens de mortalidade de machos e fêmeas de <i>S. levis</i> inoculados com os isolados de <i>M. anisopliae</i>	62
16	Tempos letais e Taxas de Potência resultantes da inoculação de adultos de <i>S. levis</i> por <i>M. anisopliae</i> . Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	64
17	Produção média de conídios dos isolados de <i>M. anisopliae</i> , pelos adultos de <i>S. levis</i> após 15 dias da inoculação. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	66
18	Médias das porcentagens de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> pelos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> . Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	69

TABELA Nº

Página

19	Análise de variância do número de adultos machos, e fêmeas, de <i>S. levís</i> mortos pelos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> . Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	70
20	Desdobramento dos graus de liberdade da análise de variância	70
21	Médias das porcentagens de mortalidade, fêmeas e machos de <i>S. levís</i> causadas pelos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>	71
22	Tempos letais (TLs_{50}) e intervalos de confiança (IC), obtidos pela inoculação com <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> . Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	74
23	Número de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> produzidos pelos adultos de <i>S. levís</i> após 21 dias da inoculação. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP	77
24	Porcentagens de sobrevivência de ovos de <i>S. levís</i> e fatores que afetam a sua mortalidade. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP ...	79
25	Número de adultos de <i>S. levís</i> mortos pelo <i>M. anisopliae</i> e por outras causas, em 3 avaliações. Piracicaba, SP .	81

TABELA Nº

Página

26	Análise da variância entre a mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> coletados em toletes de cana-de-açúcar, amostragens e sua interação. Piracicaba, SP	82
27	Médias das porcentagens de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> , obtidas em iscas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>M. anisopliae</i> e na testemunha. Piracicaba, SP	82
28	Médias das porcentagens de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> , coletados em toletes de cana-de-açúcar inoculados com <i>M. anisopliae</i>	83
29	Análise de variância entre o número de adultos de <i>S. levis</i> coletados em toletes de cana-de-açúcar, amostragens e sua interação. Piracicaba, SP ..	88
30	Número médio de adultos de <i>S. levis</i> coletados em cinco períodos de amostragens, em toletes de cana-de-açúcar com e sem fungo nas condições de campo. Piracicaba, SP, abril de 1989	89
31	Número de adultos de <i>S. levis</i> capturados em toletes de cana-de-açúcar com e sem inoculação de <i>M. anisopliae</i> . Piracicaba, SP, abril de 1989 ..	89

TABELA Nº

Página

32	Análise de variância entre a mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> , coletados em toletes de cana-de-açúcar, amostragens e sua interação. Piracicaba, SP	97
33	Médias da porcentagem de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> , coletados em iscas de cana-de-açúcar, com e sem inoculação de <i>B. bassiana</i> isolado 447. Piracicaba, SP	98

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Balão de vidro utilizado para a inoculação de adultos de <i>S. levis</i> , nas diferentes dosagens de <i>Beauveria bassiana</i> isolado 447	27
02	Caixas de poliestireno cristal, contendo seções de cana-de-açúcar, para alimentação dos adultos de <i>S. levis</i> durante o período de observação ..	28
03	Aplicação da massa fúngica nos toletes de cana-de-açúcar, no experimento de campo	37
04	Toletes de cana-de-açúcar inoculados com a massa fúngica de <i>M. anisopliae</i>	38
05	Colocação das iscas inoculadas com a massa fúngica, na base da touceira da cana-de-açúcar	39
06	Cobertura das iscas com folhas de cana-de-açúcar	39
07	Porcentagem de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> provocada por <i>B. bassiana</i> isolado 447, em quatro dosagens.	46
08	Porcentagem de mortalidade, tempos letais médios e número de conídios por adulto de <i>S. levis</i> inoculados com <i>Beauveria</i> spp.	58

FIGURA Nº

Página

09	Número de agrupamentos para dois níveis de semelhança de sete isolados de <i>Beauveria</i> spp.	59
10	Porcentagens de mortalidade, tempos letais médios e número de conídios por adulto de <i>S. levis</i> inoculados com <i>M. anisopliae</i>	67
11	Número de agrupamentos para três níveis de semelhança de sete inoculados de <i>M. anisopliae</i>	67
12	Taxas de Potência de <i>M. anisopliae</i> (259) e <i>B. bassiana</i> (447 e 290) em adultos de <i>S. levis</i> quando alimentados com pedaços de cana-de-açúcar	75
13	Porcentagem de mortalidade, tempos letais médios e número de conídios por adulto de <i>S. levis</i> quando alimentados com pedaços de cana-de-açúcar inoculados com <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> ..	78
14	Porcentagem de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> quando coletados em iscas inoculadas com o isolado 259 do <i>M. anisopliae</i> . Piracicaba, SP	84
15	Porcentagem de mortalidade média acumulada de adultos de <i>S. levis</i> coletados aos 4, 8 e 16 dias, em toletes de cana-de-açúcar inoculados com o isolado 259 de <i>M. anisopliae</i> . Piracicaba, SP	85

FIGURA Nº

Página

16	Número de adultos de <i>S. levis</i> capturados em 40 toletes de cana-de-açúcar inoculados com <i>M. anisopliae</i> isolado 259, e não inoculados (testemunha) em cinco amostragens. Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril de 1989	90
17	Número de adultos de <i>S. levis</i> capturados em 40 iscas de cana-de-açúcar (testemunha) em cinco amostragens. Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril de 1989	91
18	Número de adultos de <i>S. levis</i> capturados em 40 iscas de cana-de-açúcar, inoculadas com <i>M. anisopliae</i> isolado 259, em cinco amostragens. Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril de 1989	92
19	Médias de temperatura do solo durante o período experimental (12/04/89 a 02/05/89). Usina Santa Helena, Piracicaba, SP	94
20	Número de adultos de <i>S. levis</i> coletados em toletes de cana-de-açúcar, com e sem inoculação de <i>M. anisopliae</i> . Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril/maio de 1989	95

FIGURA Nº

Página

21	Tolete de cana-de-açúcar contaminado com <i>Aspergillus</i> spp. após 8 dias da inoculação com <i>M. anisopliae</i>	96
22	Porcentagem de mortalidade de adultos de <i>S. levis</i> quando coletados em iscas inoculadas com <i>B. bassiana</i> isolado 447. Piracicaba, SP ...	99
23	Médias das temperaturas obtidas durante o período experimental (15/05/89 a 30/05/89) na Usina Santa Helena, Piracicaba, SP	101

CONTROLE MICROBIANO DO GORGULHO DA CANA-DE-AÇÚCAR
Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (COL.: CURCULIONIDAE)
COM *Beauveria* spp. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883

Autor: FRANCISCO BADILLA FERNÁNDEZ
Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram determinar as dosagens e selecionar isolados de *Beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, assim como desenvolver uma metodologia visando ao controle do *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP e na Fazenda Retiro da Usina Santa Helena, em Piracicaba, SP.

Foram testadas 4 dosagens do isolado 447 de *B. bassiana* (Bals.) Vuill. Para a realização deste bioensaio, os insetos adultos foram colocados juntamente com cada uma das dosagens do patógeno em um frasco de vidro de 500 ml e agitados por 2 minutos, sendo posteriormente retirados e mantidos em estufa incubadora, sob a temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas. Determinou-se a dose letal (DL_{50}) de $8,8 \times 10^9$ conídios/frasco. Todavia a dosagem de 8×10^{11} conídios/frasco, foi utilizada nos bioensaios, visando selecionar os melhores isolados.

Utilizando esta metodologia avaliaram-se 7 isolados de *Beauveria* spp. e 7 de *M. anisopliae*. Os 3 melhores isolados, de cada gênero do patógeno, foram submetidos a outro bioensaio, no qual utilizaram-se pedaços de cana-de-açúcar (iscas) tratadas com os fungos.

A seleção dos isolados foi feita utilizando-se as seguintes variáveis: porcentagem de mortalidade, número de conídios produzidos por inseto, tempo letal (TL₅₀) e Potência Relativa para matar o hospedeiro. Os isolados 447 de *B. bassiana* e 259 de *M. anisopliae* foram selecionados para os testes de campo, por apresentarem as melhores características epizootiológicas. Nestas condições, na dosagem de $4,9 \times 10^{11}$ conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* por pedaço de cana-de-açúcar tratado (25 cm de comprimento), obtiveram-se respectivamente, 92,3 e 46,5% de mortalidade dos adultos de *S. levis*. As iscas de cana-de-açúcar, inoculadas com *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram eficientes para o controle de adultos de *S. levis* e a sua atratividade não foi afetada pelos patógenos.

MICROBIAL CONTROL OF SUGAR CANE WEEVIL
Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (COL.: CURCULIONIDAE)
WITH *Beauveria* spp. AND *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883

Author: FRANCISCO BADILLA FERNÁNDEZ
Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY

The objectives of this study were to determine dosages and select isolates of *Beauveria* spp. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, and develop a methodology for control of *Sphenophorus levis*, Vaurie, 1978. The research was conducted in the Insect Pathology Laboratory in the Department of Entomology of ESALQ/USP and in the Farmer Retirement of the Usina Santa Helena in Piracicaba, SP, Brazil.

Four dosages of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate 447 were tested. For the bioassay, the adult insects were placed together in a 500 ml flask, the dosage of pathogen spores was added and the mixture was agitated for 2 minutes. Afterwards the insects were removed and maintained in chambers with a constant temperature of $26.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and 12 hours photophase. It was determined that the lethal dose (LD_{50}) was 8.8×10^9 conidia/flask. However, a dosage of 8.0×10^{11} conidia/flask was used for other bioassay to select the best isolates. Using this methodology 7 isolates of *Beauveria* spp. and 7 of *M. anisopliae* were evaluated. The 3 best

isolates of each genus of pathogen were subjected to another bioassay in which pieces of sugar cane baits treated with fungi were used.

The selection of isolates was made using the following parameters: percent mortality, number of conidia produced per insect, lethal time (LT_{50}) and relative potential to kill the host. The isolates of *B. bassiana* 447 and *M. anisopliae* 259 were selected for field tests because they showed the best epizootiological characteristics. Under these conditions a dosage of 4.9×10^{11} conidia of *B. bassiana* and *M. anisopliae* per piece of treated sugar cane (25 cm in length) yielded 92.3 and 46.5% of *S. levis* adult mortality respectively. The baits of pieces of sugar cane inoculated with *B. bassiana* and *M. anisopliae* were efficient for the control of adult *S. levis* and their attractiveness was not affected by the pathogens.

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL PICUDO DE LA CAÑA DE AZÚCAR
Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (COL.: CURCULIONIDAE)
CON *Beauveria* spp. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883

Autor: FRANCISCO BADILLA FERNÁNDEZ
Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron determinar las dosis y seleccionar aislamientos de *Beauveria* spp. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, así como desarrollar una metodología para controlar adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978. La investigación fue realizada en el Laboratorio de Patología de Insectos del Departamento de Entomología de la ESALQ/USP y en la Hacienda Retiro del Ingenio Santa Helena en Piracicaba-SP, Brasil.

Fueron evaluadas 4 dosis del aislamiento 447 de *B. bassiana*. Para la realización de este experimento, los insectos adultos fueron colocados juntamente con cada una de la dosis del patógeno, en un balón de vidrio de 500 ml y agitados por 2 minutos, siendo posteriormente conservados en una incubadora a una temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y fotofase de 12 horas. Se determinó la dosis letal (DL_{50}) de $8,8 \times 10^9$ conídios/balón y se estableció la dosis de $8,0 \times 10^{11}$ conídios / balón para otros bioensayos. Utilizando esta metodología fueron evaluados 7 aislamientos de *Beauveria* spp. y 7 de *M.*

anisopliae. Los 3 mejores de cada patógeno fueron sometidos a otro bioensayo en el cual se utilizaron secciones de entrenudos de caña de azúcar (trampas) tratadas con los hongos.

La selección de aislamientos fue hecha utilizando las siguientes variables: porcentaje de mortalidad, número de conídios producidos por insecto, tiempo letal (TL_{50}) y Potencia Relativa para matar el hospedero. Los aislamientos 259 de *M. anisopliae* y 447 de *B. bassiana* fueron seleccionados para los ensayos de campo, por presentar las mejores características epizootiológicas. En estas condiciones, con la dosis de $4,9 \times 10^{11}$ conídios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* por sección de caña de azúcar (25 cm de largo), fueron conseguidos respectivamente 92,3 e 46,5% de mortalidad en los adultos de *S. levis*. Las trampas, compuestas de secciones de entrenudos de caña de azúcar inoculados con *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron eficientes para el control de adultos de *S. levis*, determinandose también que su atractividad no fue afectada por los patógenos.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância para o Brasil, já que esse país é o maior produtor mundial de açúcar e álcool, sendo o Estado de São Paulo responsável por quase 50% da produção.

Esta cultura é danificada por várias espécies de pragas, sendo este um dos fatores mais importantes na diminuição da produtividade. No Estado de São Paulo, o gorgulho *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 tem ocasionado graves prejuízos. As larvas abrem galerias nos rizomas, originando sintomas de amarelecimento e secagem de folhas e perfilhos. O dano se reflete no número de colmos finais para colheita, sendo que as perdas econômicas podem ser estimadas em relação à redução do número de toneladas esperadas de cana/ha. Assim, em alguns locais têm sido detectados 50 a 60% dos perfilhos atacados, ocasionando reduções de 20 a 30 toneladas por hectare (PRECETTI & TERÁN, 1983).

Para o controle desta praga, já foram testados os métodos químico, mecânico, cultural e de resistência de plantas, não se obtendo até o momento resultados satisfato-

tórios. Apenas a utilização de armadilhas tóxicas e a destruição de soqueiras tem mostrado alguma eficiência no controle. O uso generalizado de inseticidas não se constitui em medida aconselhável, visto que as larvas têm como hábito cavarem galerias no colmo ou rizomas, ficando abrigadas desses tóxicos, resultando em um controle ineficiente e anti-econômico.

A utilização de fungos entomopatogênicos para controle de curculionídeos, é uma alternativa que se mostra viável. Alguns testes executados no laboratório com *S. levis*, utilizando os fungos *B. bassiana* (TERÁN & PRECETTI, 1982) e *M. anisopliae* (PRECETTI et alii, 1986), mostraram-se eficientes. Assim, tornam-se necessários estudos sobre o comportamento dos isolados, dosagens e estratégias de controle a nível de campo.

Visando obter maior número de informações sobre o controle microbiano desta praga, o presente trabalho procurou selecionar os isolados e as dosagens de *Beauveria* spp. e *M. anisopliae* mais eficientes para o controle de *S. levis*, bem como, desenvolver uma metodologia para o controle de curculionídeos da cana-de-açúcar tanto no Brasil como na Costa Rica, uma vez que estes se constituem em pragas também naquele país.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. GORGULHO DA CANA-DE-AÇÚCAR *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978

Este curculionídeo vem sendo objeto de vários estudos no Estado de São Paulo, onde tem causado prejuízos. Segundo TERÁN (1987), a distribuição desta praga abrange 13 municípios ao redor de Piracicaba-SP.

VAURIE (1978) mencionou que esta espécie foi coletada pela primeira vez no Brasil atacando "Bromeliaceae", citando também a sua ocorrência na Argentina e Uruguai. A primeira ocorrência de *S. levis*, atacando cana-de-açúcar no Brasil foi feita no ano de 1977, conforme foi relatado por DEGASPARI et alii (1987).

Segundo TERÁN (1987), apesar da distribuição restrita do inseto, esta é a espécie de curculionídeo mais importante como praga da cana-de-açúcar, devido à concentração do seu ataque e por atingir canas sadias.

O adulto, geralmente, pode ser encontrado abrigado no solo. Possui coloração castanho-escuro com manchas

pretas no dorso do tórax e listras longitudinais sobre os élitros. O macho é normalmente menor que a fêmea, com 9,7 mm de comprimento, variando entre 7,7 a 11,2 mm. A região ventral é mais pilosa, principalmente na coxa dianteira, onde as cerdas se agrupam, dando um aspecto de esponja. A fêmea mede em média 11,9 mm de comprimento, variando entre 10,5 a 13,3 mm. Em condições de campo, realiza a postura endofiticamente nos rizomas da cana, abaixo do nível do solo (DEGAS-PARI et alii, 1987). Os ovos são elípticos (1,96 x 0,86 mm), branco-transparentes no início e marrom claro no final, antes da eclosão das larvas. A larva recém eclodida possui coloração branco leitosa, adquirindo posteriormente coloração amarelada. Apresenta sobre o dorso e no primeiro segmento torácico, junto à cabeça uma mancha castanho-escuro. A cabeça possui essa mesma coloração, sendo que as mandíbulas são bem desenvolvidas (TERÁN, 1987).

A pupa, logo após sua formação, é branco leitosa do tipo exarada, tornando-se castanha à medida que se aproxima a emergência do adulto (DEGASPARI et alii, 1987).

O ciclo biológico total, segundo PRECETTI & TERÁN (1983) é de 195,5 dias em média e de 173,2 de acordo com DEGASPARI et alii (1987). Estes autores concordam que a fase de maior duração é a adulta, podendo o adulto viver até 249 dias, em condições de laboratório. Com relação à capacidade de oviposição, PRECETTI & TERÁN (1983), mencionaram que foi observado em laboratório, ser em torno de 60 a 70 ovos por

fêmea podendo, no campo, ser maior ou menor em função das condições ambientais. As fêmeas podem efetuar a oviposição durante todo o tempo de sua vida.

PRECETTI et alii (1983) determinaram que os machos dispersam-se mais lentamente que as fêmeas com distâncias médias de 3 metros/dia e 5 metros/dia respectivamente, sendo que DEGASPARI et alii (1987) acharam que os adultos podem caminhar entre 6,60 e 11,10 m por mês, estando esta variação associada ao ecossistema, mudanças de temperatura e à longevidade dos adultos. Baseados nesses resultados, foi concluído que o transporte de mudas, a partir de áreas infestadas, pode ser uma importante forma de disseminação dos adultos, sendo necessário o combate aos focos para evitar sua multiplicação.

Na flutuação populacional desta espécie, o clima exerce grande influência, sendo que os adultos predominam durante os meses mais quentes e úmidos, com picos de outubro a dezembro e de março a abril, enquanto a fase larval predomina nos meses mais frios e secos (PRECETTI & TERÁN, 1983).

O conhecimento detalhado da fenologia deste inseto, tornar-se-á de grande importância para a utilização dos patógenos visando ao controle do mesmo.

2.2. EMPREGO DE *Beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DE PRAGAS

Nos últimos anos, o uso de microrganismos entomopatogênicos no controle de insetos pragas vem recebendo atenção especial. Cerca de 80% das doenças dos insetos têm como agentes etiológicos os fungos pertencentes a 90 gêneros que congregam mais de 700 espécies, sendo que dentre os gêneros mais importantes, encontram-se *Metarhizium* e *Beauveria* (ALVES, 1986a).

O primeiro trabalho de controle microbiano foi realizado por Metschnikoff em 1879, que aplicou o *M. anisopliae* para o controle de larvas do curculionídeo *Cleonus punctiventris* Germ., praga da beterraba. Seguindo estas pesquisas, em 1884 foram produzidos 55 kg do fungo, obtendo um controle de 55 a 80% de insetos em pequenas áreas, após 10 a 15 dias da aplicação (MARTIGNONI, 1968). Segundo ALVES (1986a), esse patógeno ocorre naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos, das diferentes ordens, incluindo pragas importantes.

O fungo *B. bassiana* de acordo com MACLEOD (1954), foi isolado de insetos mortos com maior frequência do que qualquer outro entomopatógeno e, segundo ALVES (1986a), infecta cerca de 200 espécies de insetos. Um dos primeiros ensaios de controle microbiano com este fungo foi feito em 1893, quando o mesmo foi testado contra larvas de *Lymantria*

monarcha L., sendo que os resultados de laboratório tiveram êxito, mas os testes de campo não foram satisfatórios. ALESHINA (1978) mencionou que este fungo tem sido o mais estudado sob o ponto de vista comercial, sendo selecionados "strains" adaptados a condições climáticas específicas, e alguns contra pragas específicas.

Um exemplo da utilização deste fungo em grande escala na cultura do milho, é o que vem acontecendo na China no controle de *Ostrinia nubilalis*, quando no ano de 1977 foram feitas aplicações em cerca de 400.000 hectares. Antes do início do programa, os danos desta praga atingiram níveis de 60%, chegando a 2%, depois de 5 anos da implantação do mesmo (HUSSEY & TINSLEY, 1981).

No controle de curculionídeos, os fungos *Beauveria* spp. e *M. anisopliae* têm sido largamente estudados (McLAUGHLIN, 1962; COTHRAN & GYRISCO, 1966; BELL & HAMALLE, 1970; GOYER & BENJAMIN, 1971; TEDDERS et alii, 1973; AYALA & MONZÓN, 1977; VENTURA et alii, 1980; MENEZES et alii, 1980; CHAMPLIN et alii, 1981; TEDDERS et alii, 1982; GOTTAWALD & TEDDERS, 1983; CAMARGO et alii, 1984; TAYRA et alii, 1984; ALVES et alii, 1986; DIAZ & GRILLO, 1986; BADILLA & ALVES, 1989 e COUTINHO & OLIVEIRA, 1989).

No Brasil, ALVES (1986a) mencionou que a ocorrência de fungos entomopatogênicos, em condições naturais, tem sido um fator importante na redução de populações de pragas. Estes patógenos oferecem possibilidades reais no con-

trole de pragas de interesse agrônômico, em culturas como soja, caupi e cana-de-açúcar (TONET & REIS, 1979; DAOUST et alii, 1983 e VILAS BOAS, 1986).

2.3. DOSAGENS UTILIZADAS DE *Beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DE PRAGAS

Segundo FERRON (1978), vários autores têm estabelecido que há uma correlação positiva entre o número de esporos infectivos e a mortalidade de insetos por fungos entomopatogênicos, mas a influência de sub-doses tem sido pouco estudada. Também foi encontrada uma correlação semelhante entre a dosagem e a mortalidade em espécies de insetos de importância agrícola (BARSON, 1977; DOBERSKI, 1981; BORGES, 1985; FERNANDES et alii, 1985; VILAS BOAS, 1986; FERNANDES, 1986; JARAMILLO & ALVES, 1986 e BADILLA & ALVES, 1989).

ALVES (1986a) mencionou que existe um número mínimo de estruturas do patógeno, necessárias para desencadear a doença, em um inseto ou população de insetos, sendo que o emprego de patógenos em subdosagens, dão resultados a curto prazo quase sempre negativos ou insatisfatórios. IGNOFFO et alii (1975) estabeleceram o nível de infecção de *Trichoplusia ni* por *Nomuraea rileyi*, como uma função da densidade de inóculo por unidade de área foliar, e, segundo FERRON (1978), a estimativa da DL_{50} varia com a raça do fungo, espécie de inseto e modo de aplicação, sendo que nos casos

em que a contaminação se realiza em forma direta a DL_{50} é menor, em relação às inoculações em forma indireta, como seria o caso de insetos de solo. Já ROBERTS & YENDOL (1971) mencionaram que os valores de DL_{50} em laboratório tendem a ser altos, desde que incluem esporos que não entram em contato com o inseto.

Com relação às dosagens e métodos de aplicação de *Beauveria* spp. e *M. anisopliae* visando ao controle de curculionídeos, os trabalhos mais importantes são relatados a seguir. Assim, LATCH & FALLON (1976) testaram o fungo *M. anisopliae* em experimentos visando o controle de *Oryctes rhinocerus* utilizando diferentes substratos de reprodução. A mortalidade das larvas após aplicação do fungo foi de 100, 80 e 30% quando a dose foi de 1390, 139 e 13,9 g/m², respectivamente.

Em Cuba, AYALA & MONZÓN (1977) realizaram testes de campo para o controle do bicudo da bananeira *Cosmopolites sordidus*. Para isso, foram colocados 10 adultos na base de cada planta utilizada no experimento, sendo que previamente tinham sido aplicados $1,6 \times 10^9$ conídios (16 gramas) de uma preparação comercial de *B. bassiana*. Os autores concluíram que os tratamentos reduziram o número de sobreviventes, quando comparados a testemunha 33 dias após a aplicação, embora o fungo não tenha evitado o ataque. No Brasil, TAYRA et alii (1984) aplicaram 1000 e 2000 conídios viáveis/inseto, conseguindo mortali-

dades no laboratório de 98 e 78% com as diferentes cepas de *B. bassiana* e *M. anisopliae* utilizadas.

O produto comercial Boverim, à base de *B. bassiana*, tem sido utilizado contra um grande número de pragas na União Soviética, incluindo várias espécies de curculionídeos. Assim, LEVCHENKO & MELASHCHENKO (1979) realizaram uma série de testes no laboratório sobre adultos de *Sitophilus granarius*. Utilizaram concentrações de 0,7 e 1%, as quais produziram uma mortalidade de 70 a 84%, 10 dias após a inoculação, sendo que, num segundo teste uma concentração de 0,3% produziu, 9 dias após, uma mortalidade de 67%.

VENTURA et alii (1980) trabalhando no laboratório, aplicaram uma suspensão de 1×10^7 conídios/ml de *M. anisopliae* sobre adultos de *Metamasius hemipterus*, praga das bananeiras e da cana-de-açúcar. A patogenicidade do fungo foi avaliada através da porcentagem da mortalidade dos insetos 10 dias após a inoculação. Nas condições do experimento, foi obtida uma porcentagem de infecção de 97,7%. Concluiu-se que *M. anisopliae* foi altamente patogênico para a fase adulta de *M. hemipterus*, evidenciando a sua possível utilização no controle desta praga.

Os gorgulhos aquáticos do arroz, da família Curculionidae, têm sido objeto de trabalhos com fungos entomopatogênicos. Assim, em Cuba, MENEZES et alii (1980) constataram que cepas do fungo *B. bassiana* provocaram maior mortalidade de adultos de *Lissorhoptrus brevirostris* do que cepas

de *M. anisopliae*, sendo promissoras para controlar o inseto, diretamente sobre plantas de arroz em lavouras irrigadas. No Brasil, MARTINS et alii (1986) testaram esses mesmos patógenos contra *Lissorhoptrus tibialis*, nas concentrações de $3,4 \times 10^8$ e 3×10^9 conídios/ml, sendo que a parcela experimental constituiu-se de um becker de 250 ml, dentro do qual foi colocado uma planta de arroz, 150 ml de água e 10 gorgulhos. De maneira geral os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, em ambas concentrações testadas, afetaram os adultos, destacando-se o isolado de *M. anisopliae* na dosagem maior.

Tedders et alii¹, citados por GOTTWALD & TEDDERS (1983) encontraram mortalidades em larvas do bicudo *Curculio caryae* de 84% e 73,9%, quando realizaram testes no laboratório com isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente. Estes autores mencionaram que os resultados obtidos foram influenciados pela virulência dos isolados, idade e tempo de exposição dos insetos ao inóculo. GOTTWALD & TEDDERS (1982) ratificaram a superioridade de *B. bassiana* sobre *M. anisopliae* no controle desta praga, mostrando que *B. bassiana* produz entre 10 a 200 vezes maior número de conídios do

¹ TEDDERS, W.L.; WEAVER, D.J.; WEHUNT, E.J. Pecan weevil: suppression of larvae with the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and the nematode *Neoplectana dutryi*. Journal of Economic Entomology, Menasha, 66: 723- 5, 1973.

que *M. anisopliae*, para um número igual de adultos infectados. GOTTWALD & TEDDERS (1983) obtiveram mortalidades de 72 e 48,8%, em adultos desta praga, quando estes entraram em contato por caminhamento com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente, aplicados em forma de pó na base de árvores de pecan. Estes autores ainda mencionaram que 44,4 e 27,8% dos insetos adultos foram contaminados e posteriormente morreram, quando estiveram em contato com insetos que tinham sido contaminados pelo método de caminhamento. Finalmente, encontraram mortalidades larvais de 29,6% para *B. bassiana* e 6,6% para *M. anisopliae* quando o inóculo foi incorporado ao solo.

A patogenicidade de *B. bassiana* a larvas do curculionídeo *Chalcodermus aeneus*, praga do caupi, foi testada por QUINTELA (1986). No laboratório, foi feito um teste com a cepa CP5 nas dosagens de $1,9 \times 10^7$, $1,9 \times 10^8$ e $1,9 \times 10^9$ conídios viáveis/ml. A dosagem de $1,9 \times 10^7$ conídios produziu baixos índices de mortalidade acumulada, sendo que a maior dosagem provocou mortalidade de 100%. Nestas condições, concluiu-se que na dosagem maior, seriam necessários 5 dias para matar 50% dos insetos (TL_{50}) e 7,5 dias para matar 90% da população (TL_{90}).

Uma das pragas para a qual têm sido realizados esforços visando ao seu controle microbiano é o bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis*. Assim, McLAUGHLIN (1962) mostrou que *B. bassiana* pode infectar larvas, pupas e adultos,

sob condições de laboratório, com umidade relativa alta. A mortalidade variou de 69 a 100% após 5 dias de inoculação, numa dosagem de $3,2 \times 10^8$ conídios/g. CAMARGO et alii (1984) testaram este fungo a nível de laboratório, numa concentração de 1×10^9 conídios/g. As inoculações foram feitas por via úmida e seca, sendo constatada uma mortalidade acima de 50%.

ALVES et alii (1986) mostraram que *B. bassiana* nas dosagens de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml foi patogênico para esta praga nas condições de laboratório. Foram determinados para estas dosagens, tempos letais médios de 33,9; 35,1; e 13,5 dias respectivamente. A DL_{50} aos 12 e 24 dias foi de $1,9 \times 10^{11}$ e 5×10^{10} conídios/ml. Trabalhando com o fungo *M. anisopliae* nas mesmas dosagens, JARAMILLO & ALVES (1986) obtiveram TL_{50} de 22,4; 11,3 e 6,3 dias, respectivamente. A DL_{50} encontrada após 12 dias foi de $7,6 \times 10^6$ conídios/ml.

GUTIERREZ (1986) encontrou, em condições de campo, que dosagens acima de 10^7 conídios/ml provocaram uma mortalidade máxima de 28% dos adultos. Determinou também que *B. bassiana* ocasionou alongamento no período de pré-oviposição, diminuição no período de oviposição e no número de ovos colocados por fêmea. Finalmente, encontrou que o efeito do fungo é mais rápido nas fêmeas do que nos machos.

2.4. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Na seleção de um patógeno devem ser levados em consideração aspectos como patogenicidade, virulência, produção de conídios/inseto, produção massal, e estabilidade no substrato onde será aplicado.

ALVES (1986c) mencionou que a virulência de um patógeno pode ser avaliada no laboratório através de bioensaios, podendo ser expressa em DE_{50} (dose efetiva mediana), DL_{50} (dose letal mediana), TL_{50} (tempo letal mediano), ou pelo cálculo da Taxa de Potência referida em UP (Unidade Padrão de Patogenicidade). Segundo este autor, os resultados de DL_{50} e TL_{50} de um mesmo isolado podem variar com a população de insetos submetidos aos bioensaios e com as condições de realização destes, sendo que a Taxa de Potência sofre menos variações, já que está sempre correlacionada com um isolado padrão que obrigatoriamente faz parte dos bioensaios.

Diversos critérios e técnicas têm sido empregados para a caracterização e seleção de isolados de *B. hassiana* e *M. anisopliae*, dentre os quais são mencionados, a produção de enzimas extracelulares (DE CONTI et alii, 1980 e ROSATO et alii, 1981), separação por análise fenética (MONTEIRO & CUNHA, 1980 e ALVES et alii, 1986), cromatografia gasosa (MESSIAS et alii, 1983), padrões eletroforéticos (SOSA-GÓMEZ & ALVES, 1983), quantificação de ácidos graxos por cro

matografia de ionização (PUPIN & MESSIAS, 1984), virulência (ALVES, 1986c), e germinação e crescimento (SAMUELS et alii, 1989).

DAOUST & PEREIRA (1986) mencionaram que a seleção de isolados altamente patogênicos tem que ser acompanhada de estudos de persistência desses isolados no campo, sendo que essa virulência é mantida, unicamente, quando os conídios desses isolados são persistentes no substrato utilizado.

2.5. USO DE ISCAS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE INSETOS

A utilização de iscas no controle de insetos é uma prática alternativa de controle, a qual visa à redução de populações. As iscas com patógenos têm a vantagem de atrair os insetos para um local com grande concentração de inóculo, protegido dos fatores abióticos e bióticos indesejáveis, como temperatura, umidade, radiação, presença de microrganismos contaminantes e antagônicos. O inóculo virulento pode entrar em contato com o inseto, tão logo este tenha acesso à isca. Assim, MESQUITA et alii (1984) testaram várias cepas dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* numa concentração de 5×10^8 conídios/ml, sobre duas espécies da broca da bananeira, *Cosmopolites sordidus* e *Metamasius hemipte-*

rus, através de três métodos distintos, sendo que um destes correspondia à imersão de iscas de pseudocaule na suspensão fúngica. As diferentes cepas provocaram 100% de mortalidade até os 12 dias, quando feita a aplicação nos adultos e iscas respectivamente. Também foi mostrado que a utilização de *B. bassiana* nas iscas, em condições de campo, provocou acentuada redução na população de brocas, apesar do índice de controle não ter ultrapassado os 15%.

Melo¹, refere uma série de recomendações para o controle do moleque da bananeira *Cosmopolites sordidus* utilizando o fungo *B. bassiana* em iscas de pseudocaule. Este autor menciona que as iscas devem ser pulverizadas com 300g de fungo suspensos em 10 litros de água, sendo trocadas a cada 15 dias, durante um período de 6 meses.

Para o controle do moleque da bananeira (*Odoiporus longicollis*) em Taiwã, Yu-Chen² citado por DELATTRE & JEAN-BART (1978) recomendou a introdução de conídios de *B. bassiana* dentro do pseudocaule da bananeira, utilizando este como isca para o controle de larvas e adultos.

¹ MELO, G.S. de. Controle biológico da broca-da-bananeira com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Palestra apresentada no 7º Curso Básico de Defesa Sanitária Vegetal, Recife, 1983.

² YU-CHEN L. Results of testing with *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill against banana stem-borer weevil larvae. Plant Protection Bulletin, Taichung, 6(2): 16-21, 1964.

COLES & PINNOCK (1984) mencionaram que a aplicação de iscas contendo o patógeno *M. anisopliae*, em pastos infestados com larvas de *Aphodius tasmaniae*, na dosagem de $1,4 \times 10^{14}$ conídios/ha, causou acima de 86% de mortalidade acumulada de larvas desta espécie, 4 meses após as aplicações.

FERNANDES et alii (1984) testaram o uso de iscas de tubérculos de *Cayaponia* sp. (taiuiã), as quais exercem efeito atrativo sobre as vaquinhas *Diabrotica speciosa* e *Cerotoma* sp. Os tubérculos foram tratados com uma suspensão de *B. bassiana*, obtendo-se uma mortalidade de 33% em casa de vegetação. Um trabalho similar foi conduzido em condições de campo, onde fatias foram tratadas com o isolado CP₅ de *B. bassiana*. Os adultos de *Diabrotica speciosa*, expostos aos tubérculos tratados, após 0, 7 e 14 dias de exposição no campo, mostraram 73, 42 e 7% de mortalidade respectivamente, sendo que para os adultos de *Cerotoma* sp. os índices de mortalidade foram 26, 27 e 18%. Concluiu-se, finalmente que *B. bassiana* persistiu por, pelo menos, uma semana no campo. Trabalhando com tubérculos da espécie silvestre de cucurbitácea *Ceratosanthes hilariana*, DAOUST & PEREIRA (1986) determinaram que os conídios de *B. bassiana* sobreviveram nestes tubérculos, quando protegidos da luz solar, por até 28 dias, com porcentagens de viabilidade próximas aos 50%. A sobrevivência dos conídios de *M. anisopliae* foi menor, devido, segundo os autores, a um possível efeito toxicogênico. Os autores

concluíram que a radiação solar e, provavelmente, a radiação ultravioleta, foram os fatores mais importantes pela rápida perda de viabilidade dos conídios, quando estes foram colocados em tubérculos com exposição total ou parcial à radiação solar. Finalmente, mencionaram que tubérculos tratados com *B. bassiana* utilizados como isca, podem ter um potencial excelente de controle de crisomelídeos em caupi, quando protegidos da incidência direta da radiação.

2.6. PERSISTÊNCIA DE *Beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* EM DIVERSOS SUBSTRATOS

O conhecimento dos fatores que influenciam a persistência dos fungos em diferentes substratos é de fundamental importância na implantação de um programa de controle biológico. Vários autores mostraram que a luz solar é a principal causa da perda de viabilidade dos esporos (IGNOFFO et alii, 1976; ZIMMERMANN, 1982; ALVES et alii, 1984 e DA OUST & PEREIRA, 1986). A persistência do fungo no solo também depende da textura, fertilidade, umidade, pH, temperatura, matéria orgânica e presença de organismos antagônicos (LINGG & DONALDSON, 1981; OLIVEIRA et alii, 1981; FERRON, 1983; FARGUES et alii, 1983 e GOTTWALD & TEDDERS, 1984).

Os solos onde se cultiva a cana-de-açúcar, por sua temperatura moderada, matéria orgânica, umi-

dade e proteção contra os raios ultravioleta, podem representar um ambiente favorável para o desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos *Beauveria* spp. e *M. anisopliae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), localizada em Piracicaba-SP. O trabalho de campo foi realizado na Usina Santa Helena, em Piracicaba-SP (latitude de 22°42'S, longitude de 47°38'W e altitude de 580 m).

3.1.1. Inseto utilizado na pesquisa

O inseto utilizado foi *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978. Nos ensaios de laboratório, foram utilizados adultos machos e fêmeas de distintas idades, procedentes de culturas de cana-de-açúcar da Usina Santa Helena.

3.1.2. Patógenos estudados

Os isolados utilizados nos experimentos foram

obtidos no banco de patógenos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP. A procedência, hospedeiros originais e datas de coleta constam nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Relação dos isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, respectivas procedências, hospedeiros originais e datas de coleta.

Denominação * do isolado	Procedência	Hospedeiro original	Data coleta
255	Ento-ESALQ/USP	<i>Anthonomus grandis</i>	02/05/84
259	Ento-ESALQ/USP	<i>Anthonomus grandis</i>	02/05/87
358	Ento-ESALQ/USP	<i>Anthonomus grandis</i>	08/04/87
507	Piracicaba-SP	<i>Solenopsis invicta</i>	01/02/87
452	Araras-SP	<i>Migdolus fryanus</i>	25/06/86
508	Piracicaba-SP	<i>Solenopsis invicta</i>	01/02/87
791	Cuiabá-MS	<i>Solenopsis</i> sp.	14/07/88

Tabela 2. Relação dos isolados de *Beauveria* spp., respectivas procedências, hospedeiros originais e datas de coleta.

Denominação * do isolado	Procedência	Hospedeiro original	Data coleta
290	Depto. Entomologia ESALQ/USP	<i>Anthonomus grandis</i>	27/06/84
292	Depto. Entomologia ESALQ/USP	<i>Anthonomus grandis</i>	23/07/84
447	Cuiabá-MS	<i>Solenopsis invicta</i>	28/02/86
455	Sta. Tereza-ES	<i>Hypotenemus hampei</i>	25/06/86
476	Ento-ESALQ/USP	<i>Cosmopolites sordidus</i>	19/09/86
695	Londrina-PR	<i>Metamasius hemipterus</i>	12/02/86
704	Cuiabá-MS	<i>Solenopsis</i> sp.	21/10/88

* Os números representam a ordem de entrada do material no Laboratório de Patologia de Insetos da ESALQ/USP.

3.1.3. Meios de cultura

- Meio BDA mais antibiótico

Batata sem casca	200 g
Dextrose	12 g
Ágar	20 g
Sulfato de Streptomicina	0,5 g
Água destilada, completar até	1000 ml

- Meio BDA-Y mais antibiótico

Batata sem casca	200 g
Dextrose	12 g
Extrato de levedura	4 g
Ágar	20 g
Sulfato de Streptomicina	0,5 g
Água destilada, completar até	1000 ml

- Meio para esporulação

KH_2PO_4	0,18 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,525 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,30 g
KCl	0,50 g
Glucose	5,00 g
NaNO_3	0,79 g
Extrato de levedura	2,50 g
Ágar	10,00 g
Água destilada, completar até	1000 ml

Todos estes meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 30 minutos.

3.1.4. Equipamentos

- Capela de fluxo vertical, marca VECO, modelo VLFS-09, para trabalhos de isolamento, purificação, repicagem dos fungos e transferência de meios de cultura para placas de Petri.

- Estufas incubadoras BOD, marca FANEM, modelo 347-G, equipadas com lâmpadas fluorescentes modelo F15-T12/LD.

- Balança marca METTLER, com indicadores digitais, modelo PB-300.

- Microscópio ótico, marca Olympus CBA 213.

- Microscópio de contraste de fase, marca American Optical.

- Câmara de Neubauer utilizada para quantificação dos inóculos.

- Agitador elétrico, marca ETICA, com capacidade de 108 a 310 rotações por minuto.

3.1.5. Outros materiais

Autoclave, estufas para esterilização a seco, placas de Petri, alça de platina, alca de Drigalsky, pinças, pincéis, lâminas, tubos de cultura, tubos de ensaio, pipetas, erlenmeyers, beakers, vazadores, piscetas, balões, fu-

nil, bisturi, espátulas, lamparina, algodão, álcool, hipoclorito de sódio 2,5%, arroz, água destilada estéril com agente molhante (Agral 1%), água destilada e deionizada, placas de poliestireno-cristal para bioensaios, caixas plásticas, colmos de cana-de-açúcar (NA 56-79), caixas de bioensaios de poliestireno cristal (19,5 x 8,4 x 2,0 cm de altura) com 6 repartições circulares de 3,5 cm de diâmetro, separador de condios e termômetro de solo.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Manutenção de *Sphenophorus levis* em laboratório

Os adultos de *S. levis*, provenientes de canaviais da Usina Santa Helena, foram mantidos em caixas plásticas, sendo alimentados com toletes de cana-de-açúcar. Os insetos mortos foram eliminados diariamente, para manter a criação livre de contaminantes. A população foi periodicamente renovada por insetos novos trazidos do campo.

3.2.2. Produção de inóculo

Os diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *M. anisopliae* armazenados em sílica gel e mantidos em geladeira

a 4°C, foram multiplicados sobre meio de cultura BDA mais antibiótico, e posteriormente repicados em meio para esporulação.

Para a inoculação dos insetos com os diferentes isolados, foram colocados 10 adultos por placa, contendo meio de cultura e fungo totalmente esporulado, por 2 minutos. Após este procedimento, os insetos foram transferidos para placas de bioensaio, com algodão umedecido visando favorecer a mortalidade e a conidiogênese. O patógeno foi reisolado a partir destes insetos, em meio BDA mais antibiótico, e repicados para meio de esporulação. Posteriormente, os diferentes isolados provenientes desse meio foram multiplicados em arroz, pelo método das bandejas, segundo ALVES (1986b). Os conídios assim obtidos foram guardados em frascos de vidro numa geladeira a 4°C, onde permaneceram para serem utilizados nos diferentes testes.

Os isolados 259 de *M. anisopliae* e 447 de *B. bassiana*, selecionados para os testes de campo, foram inoculados em adultos de *S. levis*. Depois, foram reisolados em BDA mais antibiótico e repicados uma vez em BDA-Y, visando à produção de inóculo, para a multiplicação em arroz, segundo a metodologia descrita anteriormente.

3.2.3. Experimentos de laboratório

3.2.3.1. Determinação do tempo letal médio, porcentagem de mortalidade de *Sphenophorus levis* com *Beauveria bassiana* isolado 447, em diferentes dosagens

Testou-se a patogenicidade do isolado 447 de *B. bassiana* em adultos de *S. levis* nas dosagens de $8,0 \times 10^{11}$, $8,0 \times 10^{10}$, $8,0 \times 10^9$ e $8,0 \times 10^8$ conídios por balão de 500 ml. Cada parcela do tratamento constou de 18 insetos com 5 repetições, totalizando 90 insetos por dosagem. Os insetos foram colocados em balões de vidro, em contato com a massa fúngica de cada uma das dosagens e, posteriormente, agitados por 2 minutos (Figura 1). Após a inoculação foram individualizados dentro de caixas de poliestireno cristal de 12,5 x 8,4 x 2,0 cm com 6 repartições de 3,5 cm de diâmetro, com papel de filtro umedecido (Figura 2), as quais foram mantidas em incubadoras reguladas na temperatura de $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas. Os insetos foram alimentados com pedaços de cana-de-açúcar, os quais eram trocados 3 vezes por semana, sendo que as observações de mortalidade foram executadas diariamente.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, constituídos por uma testemunha e 4 dosagens do patógeno. Também foi calculado o TL_{50} usando o método de Próbites, a partir dos trabalhos de FIN-

Figura 1. Balão de vidro utilizado para a inoculação de adultos de *S. levis*, nas diferentes dosagens de *B. bassiana* isolado 447.

NEY (1947) e SOKAL (1958), nas diferentes dosagens a que foi submetido o inseto, utilizando-se de um programa desenvolvido por HADDAD (1986). A padronização das dosagens de *B. bassiana* foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer.

Figura 2. Caixas de poliestireno cristal, contendo seções de cana-de-açúcar, para alimentação dos adultos de *S. levis* durante o processo de observação.

3.2.3.2. Avaliação da viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana* isolado 447

A avaliação da porcentagem de germinação dos conídios foi obtida colocando-se 10 microlitros de uma suspensão contendo $8,0 \times 10^7$ conídios/ml, em placas de Petri, com meio de cultura BDA e antibiótico. Esta suspensão foi espalhada em toda a superfície das placas com alça de Drigalski, sendo em seguida colocadas em estufa incubadora a 26°C e fotofase de 12 horas. Após vinte horas, foram contados, com ajuda de um microscópio ótico de 100 aumentos, 100 conídios por placa, avaliando-se os germinados e os não germinados, em 4 placas.

3.2.3.3. Potencial de inóculo de *Beauveria bassiana* isolado 447

Para se conhecer a quantidade de conídios que efetivamente permaneceram após a inoculação em contato com o tegumento do inseto, foram colocados dois adultos, sendo um macho e uma fêmea, em um tubo de vidro, com 10 ml de água destilada mais espalhante adesivo. O tubo foi levado a um agitador magnético durante 3 minutos. Em seguida, foi realizada a contagem dos conídios em suspensão, com o auxílio da câmara de Neubauer. O número de conídios por adulto foi obtido dividindo-se o número total de conídios da suspensão por dois.

3.2.3.4. Patogenicidade de isolados de
Beauveria spp. ao gorgulho
Sphenophorus levis

Para se determinar a patogenicidade e virulência de *Beauveria* spp. para os adultos de *S. levis*, foram utilizados sete isolados (Tabela 2).

A metodologia de aplicação, determinação do tempo letal (TL_{50}), potencial de inóculo e porcentagem de germinação dos conídios, dos diferentes isolados, foi semelhante à apresentada no experimento anterior, para o isolado 447. A dosagem utilizada nos sete isolados foi de $8,0 \times 10^{11}$ conídios por balão de 500 ml. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, o qual constou de 8 tratamentos, sendo uma testemunha e os sete isolados de *Beauveria* spp. Cada tratamento constituiu-se de 54 insetos, sendo que cada parcela era composta de 18 insetos, dos quais 9 eram machos e 9 fêmeas. Na análise de mortalidade de machos e fêmeas utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 7x2 com 4 repetições de 12 insetos, sendo 6 machos e 6 fêmeas.

3.2.3.5. Produção de conídios pelos cadáveres
de *Sphenophorus levis*

Foi avaliada a produção de conídios por adultos mortos pelos diferentes isolados, após 15 dias da inocu-

lação. Para isso, foram colocados uma fêmea e um macho em um tubo de vidro contendo 10 ml de água destilada mais espalhante, sendo em seguida levados a um agitador magnético durante 3 minutos. As contagens de conídios foram realizadas usando-se uma câmara de Neubauer. O número de conídios produzidos por adulto em cada um dos isolados foi obtido dividindo-se o número total da suspensão por dois.

3.2.3.6. Determinação da Taxa de Potência e análise de agrupamentos

O cálculo da Taxa de Potência (TP) dos isolados foi calculada mediante a fórmula utilizada por ALVES (1982), sendo que a Unidade Padrão de Potência foi fixada em 1000 para o *B. bassiana*, isolado 447. Finalmente foi feita uma análise de agrupamento dos sete isolados utilizando a técnica de taxonomia numérica proposta por SNEATH & SOKAL (1973). A caracterização de cada um dos isolados foi feita determinando-se os caracteres TL_{50} , TL_{90} , porcentagem de mortalidade, e número de conídios por inseto. Os cálculos foram desenvolvidos no computador CP 500 Prológica do Departamento de Entomologia - ESALQ/USP

3.2.3.7. Eficiência do *Metarhizium anisopliae* sobre os adultos de *Sphenophorus levis*

Testou-se a patogenicidade e virulência de se

te isolados de *M. anisopliae* sobre adultos de *S. levis*. A procedência, hospedeiros originais e data de coleta dos diferentes isolados encontram-se na Tabela 1.

A metodologia da aplicação dos diferentes isolados, o cálculo do TL_{50} , potencial de inóculo e porcentagem de germinação dos conídios, foram semelhantes às mencionadas nos itens 3.2.3.1, 3.2.3.2 e 3.2.3.3. A dosagem empregada foi de $8,0 \times 10^{11}$ conídios por balão de 500 ml. O delineamento estatístico utilizado foi semelhante ao descrito no item 3.3.3.4. Na análise da mortalidade de machos e fêmeas utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 7x2 com 3 repetições, contendo 18 insetos cada uma, sendo 9 machos e 9 fêmeas.

O procedimento para o cálculo do número de conídios produzidos por inseto para os diferentes isolados, já foi mencionado no item 3.2.3.5.

Foi calculada a Taxa de Potência mediante a fórmula adotada por ALVES (1982) sendo que a Unidade Padrão de Potência foi fixada em 100 para o *M. anisopliae*, isolado 507. Finalmente, foi feita uma análise de agrupamento dos isolados utilizando a metodologia proposta no item 3.2.3.6.

3.2.3.8. Patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre os adultos de *Sphenophorus levis* quando inoculados em seções de colmo de cana-de-açúcar usados como isca

Os isolados selecionados para a realização deste experimento foram os de número 507, 358 e 259 para o *M. anisopliae* e os números 455, 477 e 290 para *B. bassiana*.

Em um balão de 500 ml foram colocadas 72 seções de colmo de cana-de-açúcar sem casca (iscas), de aproximadamente 440 mm^2 de área, e $2,1 \times 10^{12}$ conídios para cada um dos isolados. Os pedaços de cana em contato com a massa fúngica foram agitados manualmente por 2 minutos. Em seguida foram colocados individualmente junto com um inseto nas células de caixas de poliestireno cristal (12,5 x 8,4 x 2,0 cm), as quais continham papel de filtro umedecido. Após a preparação das caixas contendo as seções de colmo inoculadas e as não inoculadas (testemunha), foram transferidas para estufa incubadora (BOD), reguladas na temperatura de $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Foram feitas observações diárias para determinação da mortalidade, produção de conídios por inseto, cálculo do TL_{50} para cada isolado, mortalidade do macho e fêmea e Taxa de Potência, sendo que a Unidade Padrão de Potência foi fixada em 1000 para o *M. anisopliae* isolado 259.

As iscas de cana não inoculados (testemunha) foram trocados a cada três dias, sendo que as inoculadas foram substituídos após 12 dias por pedaços de cana não inoculados.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos, constituídos por uma testemunha e seis isolados. Foram utilizados 18 insetos por repetição, perfazendo um total de 72 insetos por tratamento. Do total de 504 insetos, 252 eram fêmeas e 252 machos. No cálculo da mortalidade de machos e fêmeas, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 6x2.

Para se determinar o número de conídios por seção de colmo (isca), foi dividido o número total de conídios colocados no balão, entre o número de iscas colocados no mesmo, correspondendo este valor a $2,9 \times 10^{10}$ conídios, o que proporcionou uma concentração de $6,3 \times 10^7$ conídios /mm² do colmo.

3.2.3.9. Sobrevivência de ovos de *Sphenophorus levis*, quando colocados em iscas de cana-de-açúcar inoculadas com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Testou-se a capacidade de sobrevivência de ovos de *S. levis*, colocados pelas fêmeas em seções de colmo de cana-de-açúcar, inoculadas com *B. bassiana* isolado 447 e *M. anisopliae* isolado 259.

A metodologia de inoculação, assim como o tamanho dos pedaços de cana utilizados, foram semelhantes aos descritos no item 3.2.3.8. A dosagem aplicada foi de $2,9 \times 10^{10}$ conídios por pedaço de cana. Após a inoculação, foram colocados uma fêmea e um pedaço de cana em celas de caixas de poliestireno cristal (12,5 x 8,4 x 2,0 cm), as quais continham papel de filtro umedecido, sendo posteriormente transferidas para estufa incubadora (BOD), reguladas na temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas. Utilizaram-se 77 iscas inoculadas para os isolados 447 e 259 assim como para a testemunha. Os ovos colocados diariamente foram individualizados em caixas de poliestireno cristal (12,5 x 8,4 x 2,0 cm), com papel umedecido e mantidos em estufa incubadora regulada na temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas. Finalmente, foi determinado o número de ovos colonizados por *M. anisopliae* e *B. bassiana*, contaminados por outros fungos, inviáveis, e número de larvas eclodidas nos tratamentos.

3.2.4. Experimentos de campo

3.2.4.1. Eficiência do *Metarhizium anisopliae* isolado 259 sobre adultos do *Sphenophorus levis* quando aplicado em iscas de cana-de-açúcar

Este experimento foi efetuado após a seleção do isolado 259, no bioensaio feito em condições de laboratório. O objetivo foi avaliar a sua eficiência no campo, quan

do aplicado sobre iscas de cana-de-açúcar, assim como determinar o efeito atrativo ou repelente destas, sobre adultos de *S. levis*.

Em um saco plástico foram colocados pedaços de colmos de cana-de-açúcar de 25 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, partidos longitudinalmente e 7 g do fungo contendo $3,9 \times 10^{12}$ conídios (Figura 3). Os toletes e a massa fúngica foram agitados manualmente, para que houvesse boa distribuição do fungo sobre os mesmos, até estes ficarem inoculados, como pode ser observado na Figura 4. Em seguida, os toletes foram colocados nas fileiras do canavial com a região seccionada voltada para baixo, em pares, sendo cobertas com folhas de cana como mostrado nas Figuras 5 e 6. O mesmo procedimento foi utilizado para os toletes sem fungo (testemunha).

Utilizou-se uma dosagem de $4,9 \times 10^{11}$ conídios por tolete, correspondendo a uma concentração de $7,7 \times 10^7$ conídios por mm^2 de tolete, sendo esta concentração 20% maior do que a utilizada no ensaio de laboratório.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em parcelas subdivididas. Os tratamentos foram repetidos cinco vezes, sendo constituídos por 8 iscas, as quais foram distribuídas em linhas com 14 metros de distância entre elas, e dentro de uma mesma linha a distância entre iscas foi de 10 metros. Os blocos tinham uma área de 1260 m^2 , sendo que a área total do experimento foi de 6300 m^2 , aproximadamente.

Figura 3. Aplicação da massa fúngica nos toletes de cana-de-açúcar, no experimento de campo.

Figura 4. Toletes de cana-de-açúcar inoculados com a massa fúngica de *M. anisopliae*.

Figura 5. Colocação das iscas inoculadas com a massa fúngica, na base da touceira da cana-de-açúcar.

Figura 6. Cobertura das iscas com folhas de cana-de-açúcar.

O experimento foi conduzido na Fazenda Retiro nos talhões G₃ e G₄, da variedade SP 70-1143, com 7 meses de idade, em sistema de cultivo mínimo, correspondendo ao quarto corte.

Para verificação da temperatura do solo utilizou-se um termômetro de solo, no momento da colocação das iscas, e em cada uma das amostragens. A temperatura foi medida às 9 e às 14 horas em cinco pontos diferentes no canavial onde estavam colocadas as iscas.

As avaliações foram efetuadas aos 4, 8, 12, 16 e 20 dias após a instalação do experimento, sendo que no sétimo dia após a última amostragem, foram substituídas as iscas, e uma nova contagem dos insetos foi realizada decorridos 4 dias da substituição. Foram contados todos os insetos por isca, tanto do tratamento quanto da testemunha, sendo trazidos ao laboratório onde permaneceram com toletes de cana por 4 dias. Após esse período, foram colocados em caixas plásticas (6 cm de diâmetro por 2 cm de altura), individualizados com papel filtro umedecido e uma seção de colmo de cana-de-açúcar, a qual foi trocada a cada 4 dias. Foram coletados 100 insetos por tratamento em cada uma das amostragens.

Para se verificar a mortalidade foi feita uma revisão diária, até os 35 dias após terem sido feitas as diferentes amostragens. A mortalidade confirmada foi corrigida, utilizando a fórmula de ABBOTT (1925).

3.2.4.2. Patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* isolado 259 e *Beauveria bassiana* isolado 447 sobre os adultos de *Sphenophorus levis* quando aplicados em iscas de cana-de-açúcar

Neste experimento foram utilizados os dois isolados mais patogênicos provenientes de bioensaios de laboratório. O objetivo foi avaliar a eficiência desses isolados no campo quando os insetos permaneceram em contato com as iscas por 4, 8 e 16 dias.

A metodologia de aplicação, assim como a dosagem utilizada foi semelhante à descrita no item 3.2.4.1. O delineamento estatístico foi de blocos ao acaso em parcelas subdivididas. Os tratamentos foram repetidos 3 vezes, sendo constituídos por 6 iscas por amostragem, as quais ficaram distanciadas a 10 metros da mesma linha e 14 metros entre linhas. Cada bloco contendo os tratamentos tinha uma área de 2800 m^2 , sendo que a área total do experimento foi de aproximadamente 7400 m^2 .

O experimento foi conduzido na Fazenda Retiro, nos lotes E_4 e E_5 da variedade SP 70-1143, com sete meses de idade, sendo em sistema de cultivo mínimo, correspondendo ao terceiro corte.

Para a avaliação da temperatura do solo, foi utilizado um termômetro de solo, no momento da colocação das iscas, e durante os 16 dias após, sendo feitas duas medições

por dia, às 9 e às 14 horas. Em cada um desses horários foram feitas cinco leituras em pontos diferentes do canavial onde estavam colocadas as iscas.

As avaliações foram realizadas aos 4, 8 e 16 dias após a instalação do experimento. Para isso, foram coletados 20 insetos por repetição, totalizando 60 por tratamento. As iscas onde foram coletados os insetos foram marcadas, para não serem utilizadas na avaliação seguinte. Com isto, procurou-se assegurar que os insetos amostrados, efetivamente, estariam em contato com a isca 4, 8 ou 16 dias. Esta metodologia diferiu, portanto, do experimento anterior, no qual os insetos eram recolhidos de todas as iscas a cada 4 dias durante 20 dias.

O procedimento de acondicionamento dos insetos e avaliação de mortalidade no laboratório foi semelhante ao mencionado no item 3.2.4.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS DE LABORATÓRIO

4.1.1. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.)

Vuill. isolado 447 sobre adultos de

Sphenophorus levis Vaurie, em diferentes dosagens

4.1.1.1. Determinação do potencial de inóculo

Os resultados relativos à determinação do potencial de inóculo em número de conídios por inseto, acham-se na Tabela 3.

Tabela 3. Número de conídios de *B. bassiana* isolado 447, que efetivamente permaneceram sobre o tegumento dos adultos de *S. levis*.

Dosagem aplicada (conídios/balão) $\times 10^{11}$	Conídios/adulto	
	$n \times 10^7$	% aproximada de permanência
8	5,7	0,007
0,8	4,2	0,05
0,08	0,58	0,07
0,008	0,065	0,08

Por esses resultados, observou-se que não houve uma relação proporcional entre as dosagens utilizadas e o potencial de inóculo determinado por inseto. Assim, para uma redução de dez vezes na concentração de 8×10^{11} conídios houve uma redução de 1,35 vezes no potencial de inóculo. Dessa maneira, as reduções nas concentrações de 8×10^{10} para 8×10^9 e 8×10^8 , resultaram numa diminuição no potencial de inóculo de 7,2 e 8,9 vezes, respectivamente. Também foi determinado que a porcentagem de permanência de conídios sobre cada adulto, na dosagem de 8×10^{11} , foi 7,1, 10 e 11,4 vezes menor, em relação às dosagens de 8×10^{10} , 8×10^9 e 8×10^8 conídios/balão. Esta diferença pode ser devida a que na dosagem de 8×10^{11} , uma grande quantidade de massa fúngica não entrou em contato com os insetos.

4.1.1.2. Patogenicidade

Na Tabela 4 estão relacionadas as médias das porcentagens de mortalidade de *S. levis* provocada por *B. bassiana* isolado 447, nas quatro dosagens. A representação gráfica dos dados encontra-se na Figura 7.

Determinou-se que não houve diferença estatística entre as dosagens 8×10^{11} e 8×10^{10} . Isto pode ter ocorrido em função do potencial de inóculo resultante ter sido muito próximo, como mostrado na Tabela 3. Entre as dosagens 8×10^9 e 8×10^8 já houve diferença estatística, sendo que o

potencial de inóculo aplicado por inseto na dosagem de 8×10^9 , foi 8,9 vezes maior. Foi observado também que um aumento na dosagem, proporcionou em todos os casos um incremento na mortalidade. Resultados semelhantes foram obtidos por BADILLA & ALVES (1989) trabalhando com a mesma espécie em um ensaio preliminar. Também FERNANDES et alii (1985) e JARAMILLO & ALVES (1986), encontraram resultados parecidos com adultos do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis*.

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade acumulada de adultos de *S. levis* causada por *B. bassiana* isolado 447, após 13 dias da inoculação. Temperatura $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Tratamentos (dosagens)	Porcentagem de mortalidade	
	Médias transformadas	Médias originais
8×10^{11}	76,54 a	94,58
8×10^{10}	67,50 a	85,36
8×10^9	41,95 b	44,70
8×10^8	29,73 c	24,60
Testemunha	0 d	0

F = 83,91**

CV = 17,34%

Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 7. Porcentagem de mortalidade de adultos de *S. levis* provocada por *B. bassiana* isolado 447, em quatro dosagens.

Analisando as Tabelas 3 e 4 observou-se uma correlação positiva ($r = 0,97^*$), entre o número de conídios infectivos, e a mortalidade de adultos de *S. levis*, concordando com outros autores, mencionados por FERRON (1978), os quais encontraram essa mesma correlação.

4.1.1.3. Determinação da dose letal média

(DL₅₀) e dos tempos letais médios (TLs₅₀)

Decorridos 13 dias da instalação do experimento, determinou-se uma DL₅₀ de $8,8 \times 10^9$ conídios ($Y = -1,8531 + 0,68914 \text{ LogX}$). Comparando esse resultado com os obtidos por outros autores (CAMARGO et alii, 1984; ALVES et alii, 1986 e GUTIERREZ, 1986), com dosagens próximas às utilizadas neste ensaio, observou-se uma grande variação, concordando com FERRON (1978), o qual mencionou que a estimativa da DL₅₀ varia com a raça do fungo, espécie de inseto e forma de aplicação. O valor obtido de $8,8 \times 10^9$ conídios pode ser considerado alto, embora a quantidade de conídios que permaneceram sobre o inseto (Tabela 3), tenha sido relativamente baixa, em relação à dosagem aplicada. Estes resultados concordam com o proposto por ROBERTS & YENDOL (1971) os quais mencionaram que os valores de DL₅₀ incluem também os conídios que não entram em contato com o inseto em estudo.

Os dados referentes aos TLs₅₀, determinados para *S. levis*, submetidos a *B. bassiana* isolado 447, seus respectivos intervalos de confiança (IC), coeficientes lineares e angulares, se encontram na Tabela 5.

Por esses resultados, pode-se observar que há uma correlação negativa ($r = -0,96^*$), entre as dosagens e os TLs₅₀, sendo que à medida que se aumenta a concentração diminui o número de dias necessários para matar 50% da popula-

ção de adultos de *S. levis*. Entre as dosagens de 8×10^{11} e 8×10^{10} conídios, não houve diferença devido ao potencial de inóculo aplicado ter sido muito semelhante, como foi discutido no item 4.1.1.2. Já as dosagens de 8×10^9 e 8×10^8 apresentaram valores altos de TL_{50} , sendo estes diferentes em relação às dosagens 8×10^{11} e 8×10^{10} conídios.

Tabela 5. Tempos letais (TL_{50}) e intervalos de confiança (IC) obtidos pelo tratamento de adultos de *S. levis* com o fungo *B. bassiana* isolado 447. Temperatura: $26 \pm 0,5^\circ C$ e fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Nº de conídios por balão	TL_{50} (dias)	IC* (dias)	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)
8×10^{11}	4,1 a	3,4-4,9	2,66	3,82
8×10^{10}	4,9 a	4,2-5,7	3,14	2,70
8×10^9	14,2 b	11,2-18,1	1,47	3,01
8×10^8	22,3 b	13,9-35,6	1,05	2,93

* Intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo valores do IC ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados obtidos, pode-se confirmar que a dosagem de 8×10^{11} conídios/balão, foi a que ofereceu uma melhor performance para o controle de adultos de *S. levis*,

já que apresentou a maior mortalidade e o menor TL_{50} , embora não tenha diferido estatisticamente da dosagem de 8×10^{10} conídios/balão.

4.1.2. Patogenicidade dos isolados de *Beauveria* spp. sobre adultos de *Sphenophorus levis*

4.1.2.1. Determinação do potencial de inóculo

Na Tabela 6 acham-se os resultados relativos à determinação do potencial de inóculo dos isolados de *Beauveria* spp. em número de conídios por adulto.

Tabela 6. Número de conídios de sete isolados de *Beauveria* spp., aplicados na dosagem de 8×10^{11} conídios /balão, que efetivamente permaneceram sobre o tegumento dos adultos de *S. levis*.

Isolados	Hospedeiro original	Conídios/adulto	
		$n \times 10^8$	% aproximada de permanência
<i>B. bassiana</i> (Isolado 704)	<i>Solenopsis</i> sp.	11,0	0,14
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	<i>Solenopsis invicta</i>	9,9	0,12
<i>B. bassiana</i> (Isolado 455)	<i>Hypotenemus hampei</i>	9,5	0,12
<i>B. brongniartii</i> (Isolado 695)	<i>Metamasius hemipterus</i>	9,5	0,12
<i>B. bassiana</i> (Isolado 290)	<i>Anthonomus grandis</i>	8,5	0,12
<i>B. bassiana</i> (Isolado 292)	<i>Anthonomus grandis</i>	8,0	0,10
<i>B. bassiana</i> (Isolado 476)	<i>Cosmopolites sordidus</i>	7,5	0,09

Por esses resultados, determinou-se que da dosagem utilizada em 90 adultos de *S. levís*, ficaram em média, no tegumento, 10,4% dos conídios aplicados, sendo que 89,6% dos conídios não conseguiram se aderir à superfície do tegumento destes insetos. Em termos gerais, a quantidade de conídios que efetivamente permaneceram sobre os insetos foi bastante homogênea, diferindo apenas para os isolados 704 e 476 de *B. bassiana*.

4.1.2.2. Eficiência dos isolados de *Beauveria* spp. sobre adultos de *Sphenophorus levís*

Na Tabela 7 encontram-se os dados referentes à porcentagem de mortalidade total de *S. levís* para os isolados de *Beauveria* spp. Na Tabela 8 acha-se a análise de variância da mortalidade de machos e fêmeas com os diferentes isolados de *Beauveria* spp., sendo que na Tabela 9 apresentam-se as médias das porcentagens da mortalidade de adultos, machos e fêmeas de *S. levís*.

Analisando as mortalidades provocadas pelos isolados de *Beauveria* spp., observou-se que o isolado 447 apresentou a maior mortalidade (74,6%), sendo que os isolados 292, 455 e 290 mostraram uma mortalidade intermediária. Os isolados 476, 704 e 695 foram os menos patogênicos. A menor porcentagem de mortalidade dos isolados 704 e 695 (36,1 e 34,4%), pode ser atribuída à virulência dos mesmos, e não

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade acumulada de adultos de *S. levis* causada pelos isolados de *Beauveria* spp. após 17 dias. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Isolados	Mortalidade (%)	
	Médias transformadas	Médias originais
447	59,7 a	74,6
292	52,6 ab	63,0
455	52,6 ab	63,0
290	47,4 ab	54,2
476	39,5 b	40,5
704	36,9 b	36,1
695	35,9 b	34,4
Testemunha	11,0 c	3,7

F = 7,87**

CV = 22,2%

Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8. Análise de variância da mortalidade de adultos, machos e fêmeas, de *S. levis* por *Beauveria* spp. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

CV	GL	SQ	QM	F	Nível de significância (%)
Tratamento (TR)	6	1,55825	0,25970	1,7665 ns	12,90
Sexo (SE)	1	0,21974	0,21974	1,4947 ns	22,62
Interação (TRxSE)	6	0,66919	0,11153	0,7686 ns	60,75
Resíduo	42	6,17473	0,14702		
Total	55	8,62193			

CV = 19,2%

Dados transformados em $\sqrt{x+0,6}$

ao potencial de inóculo, já que o isolado 695 de *B. brongniartii* apresentou um potencial de inóculo de $9,5 \times 10^8$ conídios, praticamente igual ao isolado 447 ($9,9 \times 10^8$ conídios), sendo que entre estes, houve uma diferença significativa de 40,2% de mortalidade. O mesmo ocorreu com a utilização do isolado 704, que proporcionou um potencial de inóculo de 11×10^8 conídios/inseto, causando uma mortalidade de apenas 36,1%.

Tabela 9. Médias das porcentagens de mortalidade de adultos, machos e fêmeas de *S. levis* inoculados com *Beauveria* spp.

Tratamento	Mortalidade ^{1/} %
Machos	46,40 a
Fêmeas	53,53 a

^{1/} Média de 28 repetições

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de F, ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando os dados contidos nesta tabela, pode-se observar que não houve diferença significativa na sensibilidade de machos e fêmeas de *S. levis* ao fungo *Beauveria* spp., embora a mortalidade das fêmeas tenha sido 7,2 pontos porcen

tuais menor do que a dos machos. Este fato pode ser devido ao maior tamanho destas, resultando em um maior potencial de inóculo, e conseqüentemente, maior mortalidade.

4.1.2.3. Determinação dos tempos letais médios e Taxa de Potência

Os tempos letais médios (TL_{50}), para *S. levis* submetidos aos isolados de *Beauveria* spp., seus respectivos intervalos de confiança (IC), Taxa de Potência (TP), coeficientes lineares e angulares são apresentados na Tabela 10.

O isolado que apresentou menor TL_{50} foi o 447, já os isolados de *B. bassiana* (292 e 455) ficaram em um grupo intermediário, sendo suas Taxas de Potência menores do que a do isolado 447 utilizado como padrão. O isolado 290 de *B. bassiana* apresentou o maior tempo letal. Os isolados 476 e 704 de *B. bassiana* e 695 de *B. brogniartii* apresentaram porcentagens de mortalidade de 40,5; 36,1 e 34,4 respectivamente, após 17 dias da inoculação. Embora todos os isolados tenham sido inoculados em adultos de *S. levis*, e reisolados para a realização deste teste, o comportamento foi muito variável, mostrando que a virulência é uma característica própria da linhagem utilizada. Uma alta variabilidade na patogenicidade foi também encontrada por FARGUES (1972), quando testou sete isolados de *B. bassiana* contra *Leptinotarsa decemlineata*. O autor

Tabela 10. Tempos letais e taxas de potência resultantes da inoculação de adultos de *S. levis* por *Beauveria* spp. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Isolados	TL ₅₀ (dias)	I.C.*	TP	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	5,5	4,5-6,6	1000 a	2,76	1,70
<i>B. bassiana</i> (Isolado 292)	9,5	8,2-11,1	579 b	2,57	2,51
<i>B. bassiana</i> (Isolado 455)	9,6	8,2-11,3	573 b	2,40	2,64
<i>B. bassiana</i> (Isolado 290)	11,6	8,2-11,3	474 b	2,19	2,64
<i>B. brogniartii</i> ** (Isolado 695)	-	-	-	-	-
<i>B. bassiana</i> ** (Isolado 476, 704)	-	-	-	-	-

* Ao nível de 5% de probabilidade.

** Não atingiram 50% de mortalidade.

Taxas de potência seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelos valores do IC ao nível de 5% de probabilidade.

mencionou que um dos isolados causou 100% de mortalidade em 5 dias, enquanto os menos virulentos causaram 10% de mortalidade após 20 dias.

Tentando explicar a virulência de *B. bassiana* em *Heliothis zea*, PEKRUL & GRULA (1979) utilizaram mutantes exibindo níveis altos e baixos de virulência,

sendo que nestes últimos a maioria dos conídios que germinaram produziram hifas, as quais cresceram sobre o tegumento do inseto de maneira desgovernada, sendo que só uma pequena quantidade penetrou depois de um extensivo alongamento, ao contrário dos mutantes altamente patogênicos, cuja penetração ocorreu logo após a germinação. Segundo estes autores, no processo de penetração estão envolvidas atividades enzimáticas e mecânicas; porém, a baixa patogenicidade dos mutantes com crescimento hifal desgovernado, não é simplesmente consequência da falta de uma série de enzimas supostamente necessárias para a penetração no tegumento. Para CHAMPLIN et alii (1981), não há uma correlação positiva entre a virulência e a síntese de enzimas extracelulares (quitinase, proteínase e lipase), embora tenham constatado que a penetração no tegumento envolva a ação de enzimas extracelulares.

Segundo PARIS & FERRON (1979), a virulência em *B. bassiana* está ligada à presença de duas características, uma atividade lipolítica e um arco de precipitação específico, obtido por imunoeletroforese. Os autores ainda mencionaram que estes dois fatores sozinhos não são suficientes para explicar a virulência de um determinado isolado, já que mutantes produtores de lipase e do arco de precipitação se mostraram avirulentos. Estes mutantes conseguem penetrar no tegumento, mas são pouco eficientes em alguns dos processos que induzem a morte do hospedeiro.

Assim, a virulência é regida por uma série de fatores, tornando-se sumamente complexa sendo, portanto, necessário, para um controle de pragas, estudar além desses fatores, o maior número possível de isolados, visando encontrar o máximo de variabilidade, para selecionar os mais eficientes.

4.1.2.4. Produção de conídios em cadáveres de adultos de *Sphenophorus levis*

O número de conídios de *Beauveria* spp. produzidos por adulto de *S. levis*, após 15 dias da inoculação encontra-se na Tabela 11. A representação gráfica dos dados não transformados, constam na Figura 8. Na Figura 9 apresenta-se o fenograma obtido para os caracteres TL_{50} , TL_{90} , porcentagem de mortalidade e número de conídios por inseto para sete isolados de *Beauveria* spp.

Ao se analisar a Figura 8, pode-se notar que os isolados que apresentaram melhor performance foram os de número 447, 292, 455 e 290 de *B. bassiana*. O isolado 695 de *B. brongnartii*, mostrou uma patogenicidade muito baixa, conseguindo matar apenas 35,2% dos adultos em 10 dias. Assim, os isolados de *B. bassiana* foram mais eficientes para o controle dos adultos de *S. levis*.

Para os testes seguintes foram selecionados os isolados 447, 455 e 290. Embora o isolado 292 tenha se mostrado mais virulento em relação ao iso-

lado 290, essa diferença não foi significativa (Tabela 10), sendo que este último produziu significativamente maior número de conídios/inseto (Tabela 11), característica importante a ser levada em consideração num programa de controle biológico com fungos entomopatogênicos. Além disso, este isolado apresentou maior facilidade para reprodução em meio de cultura (BDA-Y), e em arroz.

Tabela 11. Produção média de conídios de sete isolados de *Beauveria* spp. em adultos de *S. levis*, após 15 dias da inoculação. Temperatura: $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Isolados	Conídios / adulto	
	Médias transformadas	Médias originais $\times 10^9$
<i>B. bassiana</i> (Isolado 290)	1,29 a	1,26
<i>B. bassiana</i> (Isolado 704)	1,21 ab	0,96
<i>B. bassiana</i> (Isolado 455)	1,15 ab	0,73
<i>B. bassiana</i> (Isolado 476)	1,11 ab	0,73
<i>B. brongniartii</i> (Isolado 695)	0,98 ab	0,46
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	0,95 b	0,42
<i>B. bassiana</i> (Isolado 292)	0,93 b	0,37

F = 3,49*

CV = 14,9%

DMS = 0,326

Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 8. Porcentagem de mortalidade, tempos letais médios e número de conídios por adulto de *S. levis* inoculados com *Beauveria* spp.

A Figura 9 mostra a análise de agrupamento realizada para os sete isolados de *Beauveria* spp., na qual os isolados 290 e 292 ficaram num mesmo agrupamento ao nível de 0,75 de semelhança, demonstrando assim a grande importância da análise fenética para separação de isolados, visando a sua utilização em programas de controle microbiano de insetos. Esta técnica também foi utilizada por ALVES et alii (1986) para separação de isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Figura 9. Número de agrupamentos para dois níveis de semelhança de sete isolados de *Beauveria* spp.

4.1.3. Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* para adultos de *Sphenophorus levis*

4.1.3.1. Determinação do potencial de inóculo

As quantidades de conídios dos isolados de *M. anisopliae* que permaneceram sobre o tegumento dos insetos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Número de conídios de sete isolados de *M. anisopliae*, aplicados na dosagem de 8×10^{11} conídios/balão, que efetivamente permaneceram sobre o tegumento dos adultos de *S. levis*.

Isolados	Hospedeiro original	Conídios/adulto	
		$n \times 10^8$	% aproximada de permanência
452	<i>Migdolus fryanus</i>	16,5	0,20
507	<i>Solenopsis invicta</i>	14,0	0,17
358	<i>Anthonomus grandis</i>	12,0	0,15
259	<i>Anthonomus grandis</i>	12,0	0,15
508	<i>Solenopsis invicta</i>	11,5	0,14
255	<i>Anthonomus grandis</i>	11,0	0,14
791	<i>Solenopsis</i> sp.	7,0	0,08

4.1.3.2. Eficiência dos isolados do *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Sphenophorus levis*

Os dados referentes à porcentagem de mortalidade acumulada de *S. levis*, nos diferentes isolados acham-se na Tabela 13. A análise de variância e as médias das porcentagens de mortalidade de machos e fêmeas, encontram-se nas Tabelas 14 e 15 respectivamente.

Tabela 13. Porcentagens de mortalidade de adultos de *S. levis* causadas pelos isolados de *M. anisopliae* após 22 dias. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Isolados	Porcentagens de mortalidade	
	Médias transformadas	Médias originais
507	64,6 a	81,6
358	57,4 ab	70,9
259	56,1 ab	68,9
452	54,8 ab	66,7
255	51,5 bc	61,3
508	50,4 bc	59,3
791	41,8 c	44,2
Testemunha	11,0 d	3,7

F = 22,99**

CV = 12,3%

Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 14. Análise de variância da mortalidade de machos e fêmeas de *S. levis* provocada pelos isolados de *M. anisopliae*.

CV	GL	SQ	QM	F	Nível de significância (%)
Tratamento (TR)	6	1,62562	0,27094	0,5722 ns	75,05
Sexo (SE)	1	0,04696	0,04696	0,0992 ns	75,31
Interação (TRxSE)	6	0,51111	0,08518	0,1799 ns	97,87
Resíduo	28	13,25724	0,47347		
Total	41	15,44091			

CV = 28,6%

Dados transformados em $\sqrt{x+0,6}$

Tabela 15. Médias das porcentagens de mortalidade de machos e fêmeas de adultos de *S. levis* inoculados com os isolados de *M. anisoplíae*.

Tratamento	Mortalidade $\frac{1}{2}$ (%)
Machos	51,4 a
Fêmeas	48,6 a

$\frac{1}{2}$ Valor médio de vinte e uma repetições.

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados que constam da Tabela 13, pode-se observar que o isolado 507, originário de *Solenopsis invicta* foi o que produziu a maior porcentagem de mortalidade, enquanto os isolados 358, 259 e 452 apresentaram uma mortalidade intermediária, porém sem serem significativamente diferentes do isolado 507. Os isolados 255, 508 e 791 foram os menos patogênicos. Em geral, houve uma relação direta entre o nível de mortalidade e o potencial de inóculo. Assim, os isolados que apresentaram as menores porcentagens de mortalidade também apresentaram os menores potenciais de inóculo (Tabela 12). O isolado 507 de *Solenopsis invicta* apresentou uma mortalidade 1,8 vezes maior do que o isolado 791, sen

do que o potencial de inóculo do primeiro foi duas vezes maior do que o do segundo. Estes resultados concordam com FERRON (1978) o qual mencionou que há uma correlação positiva entre o número de conídios infectivos e a mortalidade.

Embora não tenham sido encontrados trabalhos semelhantes na literatura, referente à metodologia de inoculação, pode-se mencionar os resultados obtidos por CAMARGO et alii (1985). Estes autores inocularam adultos de *A. grandis* por caminhamento dos insetos em 16 gramas de conídios de um isolado de *M. anisopliae*, originário de *Cosmopolites sordidus*, com concentração de 1×10^9 conídios/grama. Com esta metodologia obtiveram uma mortalidade de 100% após 7 dias, diferindo portanto dos resultados encontrados neste experimento, onde a mortalidade média para os sete isolados foi de 64,7%, variando de 44,2% no isolado 791 em 20 dias a 81,6% em 22 dias no isolado 507. Estes resultados mostram que a patogenicidade depende da espécie de inseto, raça do fungo e metodologia de aplicação.

4.1.3.3. Determinação dos tempos letais médios e Taxa de Potência de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre *Sphenophorus levis*

Os tempos letais médios (TL_{50}), para adultos de *S. levis*, obtidos de diferentes isolados, seus intervalos de confiança (IC), Taxa de Potência (TP), coeficientes lineares e angulares, encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16. Tempos letais e Taxas de Potência resultantes da inoculação de adultos de *S. levis* por *M. anisopliae*: Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Isolados	TL ₅₀ (dias)	IC*	TP	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)
507	9,4	8,4-10,4	1000 a	1,70	3,39
259	11,1	10,1-12,3	847 a	2,13	2,74
358	11,2	10,1-12,3	839 a	2,17	2,70
255	13,4	12,2-14,6	701 b	2,34	2,35
508	13,5	12,5-14,5	696 b	1,64	2,96
452	13,8	12,9-14,6	681 b	0,55	3,91
791**	-	-	-	-	-

* Ao nível de 5% de probabilidade.

** Não atingiu 50% de mortalidade.

Taxas de Potência seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelos valores do IC ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados obtidos, observou-se que os isolados mais virulentos depois do isolado padrão (507) foram o 259 e o 358, ambos originários de *A. grandis*. Os isolados 255, 508 e 452 foram os que apresentaram respectivamente as menores Taxas de Potência. A menor Taxa de Potência foi do isolado 452 proveniente de *Migdolus fryanus*, sendo esta característica própria da linhagem, já que o seu potencial do inóculo foi o mais elevado (Tabela 12).

Pelo discutido, demonstrou-se que a virulência é uma característica da linhagem, mas a sua expressão também depende do hospedeiro, forma de inoculação e das condições onde foi realizado o bioensaio.

Tentando explicar a virulência do *M. anisopliae*, SAMUELS et alii (1989) testaram 24 isolados contra *Nilaparvata lugens* (Delphacidae), praga importante do arroz. Os autores concluíram que houve uma correlação positiva entre a virulência e as seguintes características: pequeno volume dos esporos, rápida germinação e rápido crescimento em meio de cultura a 28°C. Também encontraram que não houve correlação entre a patogenicidade e a produção de enzimas, embora a atividade conjunta das enzimas quitinase, lipase e protease em ausência de amilase foram características dos isolados altamente patogênicos.

4.1.3.4. Produção de conídios pelos cadáveres de adultos de *Sphenophorus levis*

O número de conídios produzidos por adultos de *S. levis* quando inoculados com *M. anisopliae* encontra-se na Tabela 17. A representação gráfica dos dados não transformados, constam da Figura 10, sendo que na Figura 11 encontra-se o fenograma obtido para os caracteres TL₅₀, TL₉₀, porcentagem de mortalidade e número de conídios por inseto, por isolado do *M. anisopliae*.

Tabela 17. Produção média de conídios dos isolados de *M. anisopliae*, pelos adultos de *S. levis* após 15 dias da inoculação. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Isolados	Conídios/adulto	
	Médias transformadas	Médias originais $\times 10^9$
507	1,97 a	3,84
358	1,94 a	3,74
259	1,78 ab	3,10
452	1,58 abc	2,46
255	1,47 abc	2,13
508	1,38 bc	1,86
791	1,25 c	1,51

F = 2,97*

CV = 14,9%

Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados obtidos pode-se inferir que os isolados 507, 358 e 259 foram os que apresentaram a maior produção de conídios por inseto, embora sem serem estatisticamente diferentes dos isolados 452 e 255. Os isolados 508 e 791 apresentaram as menores produções de conídios, sendo estatisticamente diferentes dos isolados 507 e 358.

Figura 10. Porcentagens de mortalidade, tempos letais médios e número de conídios por adulto do *S. levis* quando inoculados com *M. anisopliae*.

Figura 11. Número de agrupamentos para três níveis de semelhança de sete isolados de *M. anisopliae*.

Os isolados que provocaram maiores porcentagens de mortalidade, menores tempos letais e maior produção de conídios por adulto foram os de número 507, 358, 259 e 452 (Figura 10). Para os testes seguintes foram selecionados os isolados 507, 259 e 358, os quais apresentaram as maiores Taxas de Potência (Tabela 16), ficando também em dois agrupamentos a um mesmo nível de semelhança (Figura 11). A partir de 11 isolados de *M. anisopliae* SOSA-GÓMEZ & ALVES (1983) selecionaram o SPL-52T e PL-39 como os mais promissores para serem utilizados no controle microbiano, desde que apresentaram elevadas Taxas de Potência. Segundo ALVES (1986c), a Taxa de Potência é o critério mais adequado para avaliar a virulência de um determinado grupo de isolados, já que sofre menor variação, pois sempre está correlacionada com um isolado padrão que obrigatoriamente faz parte dos bioensaios.

A utilização dos parâmetros, porcentagem de mortalidade, virulência e produção de conídios no hospedeiro, também foram utilizados por SOARES et alii (1983). Estes testaram 3 isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e um isolado de *M. flavoviride* contra larvas do curculionídeo *Oti orhynchus sulcatus*, sendo selecionado o isolado N° 85 de *M. anisopliae*, como o mais eficiente para controle desta praga em casa de vegetação.

4.1.4. Inoculação do *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em pedaços de cana-de-açúcar usados como iscas

4.1.4.1. Eficiência dos isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Sphenophorus levis*

As médias das porcentagens de mortalidade de *S. levis* provocadas pelos diferentes isolados acham-se na Tabela 18. A análise de variância, e as médias das porcentagens de mortalidade de fêmeas e machos encontram-se nas Tabelas 19, 20 e 21 respectivamente.

Tabela 18. Médias das porcentagens de mortalidade de adultos de *S. levis* pelos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Temperatura: $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Patógenos	Porcentagens de mortalidade	
	Médias transformadas	Médias originais
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 259)	56,27 a	69,17
<i>B. bassiana</i> (Isolado 290)	51,82 ab	61,79
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	49,28 ab	57,45
<i>B. bassiana</i> (Isolado 455)	42,41 ab	45,50
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 507)	39,20 b	39,92
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 358)	35,67 b	34,00
Testemunha	3,40 c	0,35

F = 12,44**

CV = 25,01%

Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$.

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 19. Análise de variância do número de adultos machos e fêmeas de *S. levis* mortos pelos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Temperatura: 26±0,5°C; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

CV	GL	SQ	QM	F	Nível de significância (%)
Tratamento (TR)	5	3,09772	0,61954	10,87**	0,00
Sexo (SE)	1	2,96297	2,96297	52,01**	0,00
Interação TRxSE	5	1,08860	0,21772	3,82**	1,09
Resíduo	24	1,36728	0,05697		
Total	35	8,51657			

CV = 9,36%

Dados transformados em $\sqrt{x+0,6}$.

Tabela 20. Desdobramento dos graus de liberdade da análise de variância.

CV	GL	SQ	QM	F	Nível de significância (%)
Sexo dentro Isolado 358	1	2,1371	2,1371	37,51**	0,00
Sexo dentro Isolado 507	1	0,0130	0,0130	0,23ns	63,48
Sexo dentro Isolado 259	1	0,3940	0,3940	6,93*	1,46
Sexo dentro Isolado 455	1	0,3460	0,3460	6,07*	2,13
Sexo dentro Isolado 447	1	0,9670	0,9670	16,98**	0,04
Sexo dentro Isolado 290	1	0,1930	0,1930	3,39ns	7,78
Trat. dentro Sexo ♀	5	2,7080	0,5420	9,51**	0,00
Trat. dentro Sexo ♂	5	1,4770	0,2960	5,19**	0,23

CV = 9,36%

Dados transformados em $\sqrt{x+0,6}$.

Tabela 21. Médias das porcentagens de mortalidade de adultos, fêmeas e machos de *S. levis* causadas pelos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

Tratamento	Mortalidade $\frac{1}{\%}$
Fêmeas	61,54 a
Machos	38,46 b

F = 52,01**

$\frac{1}{\%}$ Valor médio de dezoito repetições.

Médias seguidas de letras diferentes são diferentes entre si pelo teste de F ao nível de 1% de probabilidade.

Pelos resultados apresentados na Tabela 18, pode-se inferir que houve diferença significativa entre os isolados e a testemunha (F = 12,44**). Tanto os isolados de *M. anisopliae* quanto os de *B. bassiana* foram patogênicos para *S. levis*, quando inoculados em pedaços de cana-de-açúcar. O isolado 259 de *M. anisopliae* foi o mais patogênico, embora não tenha diferido estatisticamente dos isolados 290, 447 e 455 de *B. bassiana*, mas sim dos isolados 507 e 368 de *M. anisopliae*.

De modo geral, a mortalidade média obtida utilizando esta técnica (51,8%) foi menor que a obtida quando a aplicação dos fungos foi realizada diretamente nos adultos (68,9%). Essa diferença (17,1%) possivelmente ocorreu em fun

ção do potencial de inóculo, já que permaneceram em média, $6,8 \times 10^8$ conídios/inseto (Tabelas 6 e 12), enquanto que para os pedaços de cana foram inoculados $6,3 \times 10^7$ conídios/mm². Estes resultados concordam com os obtidos por YADAVA et alii (1979), os quais utilizaram a inoculação por caminhamento dos insetos sobre a massa fúngica de conídios de *B. brogniartii*, comparando com o fornecimento de talos de arroz, molhados numa suspensão de conídios, visando ao controle de pragas desta cultura. Os autores obtiveram 90 e 35% de mortalidade das larvas, para os dois métodos de inoculação, respectivamente.

Analisando-se a mortalidade de machos e fêmeas (Tabelas 19 e 20), observou-se que houve diferença significativa entre os isolados e a sensibilidade dos insetos conforme o sexo ($F = 3,82^{**}$). As fêmeas apresentaram um nível de mortalidade de 23% superior à obtida com os machos (Tabela 21). Mortalidades maiores de fêmeas foram também obtidas por KELLER (1978) quando inoculou adultos de *Melolontha melolontha* com o fungo *B. tenella*. O autor mencionou que obteve uma mortalidade de 61 a 92,5% para as fêmeas e 79,2 a 88,4% para os machos, referindo-se também que a sanidade da progênie dos adultos infectados foi prejudicada.

A maior mortalidade das fêmeas de *S. levis* pode ter ocorrido em função da alimentação, já que as mesmas alimentam-se mais que os machos, permanecendo por mais tempo em contato com os pedaços de cana-de-açúcar inoculados com os fungos, podendo assim as regiões intersegmentais das per

nas e do abdome ficar em contato estreito com a massa fúngica, favorecendo a contaminação. Observou-se também que as fêmeas, ao serem colocadas junto às iscas, agarravam-se às mesmas imediatamente, sendo que os machos demoravam mais tempo, alimentando-se destas por períodos curtos. Quando em contato com as fêmeas, passavam a maior parte do tempo sobre as mesmas, em posição de cópula, enquanto estas permaneciam aderidas aos toletes de cana utilizados como alimento.

ZACHARUK (1970) mostrou que a penetração do *M. anisopliae* em larvas de elaterídeos ocorre nas regiões intersegmentais por meio da ação inicial do apressório, no qual acham-se células com inúmeras mitocôndrias, dictiosomas, ribossomas e retículo endoplasmático, mostrando assim uma alta atividade metabólica. A formação de apressório também foi demonstrado em *B. bassiana* (VEY & FARGUES, 1977).

Com relação à infecção de *B. bassiana* e *M. anisopliae* via alimentar BROOME et alii (1976) encontraram que este mecanismo pode ocorrer em *Solenopsis richteri*, ainda estes autores mencionaram que outros pesquisadores teriam encontrado resultados semelhantes em várias espécies de insetos. Também DOBERSKI (1981) mencionou que a mortalidade de adultos de *Scolytus scolytus*, poderia ter ocorrido por contato dos confídios com o tegumento e por ingestão destes, enquanto os besouros faziam galerias nos discos de alimentação de cascas de árvores, inoculadas com os patógenos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

4.1.4.2. Determinação dos tempos letais médios e Taxa de Potência

Os tempos letais médios (TLs₅₀) para adultos de *S. levis* inoculados com os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* alimentados com pedaços e cana contendo $2,76 \times 10^{10}$ conídios, seus intervalos de confiança (IC), Taxa de Potência (TP), coeficientes lineares e angulares são apresentados na Tabela 22. A representação gráfica das Taxas de Potência encontram-se na Figura 12.

Tabela 22. Tempos letais (TLs₅₀) e intervalos de confiança (IC), obtidos pela inoculação com *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Temperatura: $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Patógenos	TL ₅₀ (dias)	IC*	TP	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 259)	14,9	14,2-15,6	1000 a	1,61	2,89
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	15,8	14,4-17,1	943 a	2,30	2,25
<i>B. bassiana</i> (Isolado 290)	17,2	16,4-17,9	866 b	2,10	2,34
<i>B. bassiana</i> ** (Isolado 455)	-	-	-	-	-
<i>M. anisopliae</i> ** (Isolados 507, 358)	-	-	-	-	-

* Ao nível de 5% de probabilidade.

** Não atingiram 50% de mortalidade.

Taxas de Potência seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelos valores do IC, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 12. Taxas de Potência de *M. anisopliae* (259) e *B. bassiana* (447 e 290) em adultos de *S. levis* quando alimentados com pedaços de cana-de-açúcar.

Analisando-se os tempos letais resultantes de inoculações dos isolados 259 de *M. anisopliae* e o 447 de *B. bassiana* observa-se que os mesmos apresentaram valores muito próximos (14,9 e 15,8 dias, respectivamente) assim como as suas Taxas de Potência (Tabela 22). Já a aplicação do isolado 290 de *B. bassiana* resultou em tempo letal e Taxa de Potência menores. Os isolados 455, 507 e 358 provocaram mortalidades menores do que 50%. Os valores de TL_{50} obtidos para todos os isolados foram em média 1,7 vezes maiores do que obti-

dos quando estes foram inoculados diretamente sobre os insetos (Tabela 10 e 16). Isto ocorreu, possivelmente, em função do método de aplicação, já que a quantidade de conídios que entrou em contato com o tegumento foi maior no processo de inoculação direta dos insetos.

Alguns autores têm mencionado que aumentos no potencial de inóculo podem resultar em diminuição dos tempos letais. Assim, ALVES et alii (1986) mostraram que uma diminuição no potencial de inóculo do isolado 61 de *B. bassiana* aumentou o TL_{50} para adultos de *A. grandis*.

4.1.4.3. Produção de conídios pelos cadáveres de adultos de *Sphenophorus levis*

O número de conídios dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* produzidos por adulto de *S. levis*, após 21 dias do contato com os toletes tratados encontram-se na Tabela 23, sendo que na Figura 13 está a representação gráfica das médias não transformadas.

Pelos resultados mostrados na Tabela 23, pode-se observar que o isolado de *B. bassiana* número 455 proveniente de *Hypotenemus hampei* produziu o maior número de conídios/adulto, diferindo estatisticamente dos isolados números 259, 507 e 358 de *M. anisopliae*. Também determinou-se que os isolados de *B. bassiana* produziram em média 1,77 vezes mais conídios por inseto, quando comparados aos isola-

dos de *M. anisopliae*. Estes dados concordam com os obtidos por GOTTWALD & TEDDERS (1982), os quais mencionaram que *B. bassiana* produziu de 10 a 200 vezes mais conídios do que o *M. anisopliae*, para um número equivalente de adultos do *Curculio caryae*.

Tabela 23. Número de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* produzidos pelos adultos de *S. levis* após 21 dias da inoculação. Temperatura: $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Patógenos	Conídios/adulto	
	Médias transformadas	Médias originais $\times 10^9$
<i>B. bassiana</i> (Isolado 455)	2,89 a	8,13
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	2,78 ab	7,12
<i>B. bassiana</i> (Isolado 290)	2,32 ab	4,80
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 259)	1,53 b	1,74
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 507)	1,51 b	1,69
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 358)	1,47 b	1,57

F = 2,80*

CV = 38,7%

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 13. Porcentagens de mortalidade, tempos letais médios e número de conídios por adulto de *S. levis* quando alimentados com pedaços de cana-de-açúcar inoculados com *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

Os isolados que provocaram maior mortalidade, e menores tempos letais, foram os de número 259, 290 e 447 (Figura 13). Os isolados 259 e 447 apresentaram as maiores Taxas de Potência, sendo estas diferentes daquela calculada para o isolado 290 (Tabela 22). Para os testes de campo, foram selecionados os fungos *M. anisopliae* isolado 259 e *B. bassiana* isolado 447. O isolado que mostrou melhor performance foi o 447 oriundo de *Solenopsis invicta*, já que apresentou uma alta virulência e maior produção de conídios/

inseto, requisitos fundamentais de um patógeno para ser utilizado em um programa de controle microbiano. Um outro aspecto importante é que o isolado é proveniente de um inseto de hábitos subterrâneos tal como o *S. levis*.

4.1.4.4. Sobrevivência de ovos de *Sphenophorus levis* quando ovipositados em iscas de cana-de-açúcar

As porcentagens de sobrevivência de ovos de *S. levis* quando ovipositados em iscas de cana-de-açúcar, inoculadas com *M. anisopliae*, *B. bassiana* e sem estes, é apresentada na Tabela 24.

Tabela 24. Porcentagens de sobrevivência de ovos de *S. levis*, e fatores que afetam a sua mortalidade. Temperatura: $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase: 12 horas. Piracicaba, SP.

Tratamentos	Porcentagem			
	Ovos parasitados	Ovos contaminados	Ovos inviáveis	Sobrevivência
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 259)	65,0	25,0	10,0	0
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	14,6	39,6	45,8	0
Testemunha	0	56,6	23,6	20

Analisando os fatores que afetaram a viabilidade dos ovos, pode-se observar que, quando estes foram ovipositados em pedaços de cana, inoculados com os patógenos, obteve-se uma mortalidade média de 39,8%. Os contaminantes, em sua maioria representados pelo *Aspergillus* spp., foram responsáveis por uma mortalidade média de 40,4%. Por outro lado, encontrou-se uma média de 26,4% de ovos inviáveis. A ação dos contaminantes pode ter ocorrido, em função da atuação primária dos patógenos, abrindo caminho para o processo de colonização de agentes secundários, representados por fungos e bactérias, e também pela degradação dos pedaços de cana, onde os ovos foram colocados. Um outro fator que pode ter favorecido a alta porcentagem de ovos contaminados, foi o seu manuseio no laboratório, já que estes não foram desinfestados.

A ação conjunta dos patógenos, contaminantes e o efeito da mortalidade natural dos ovos, não permitiu a eclosão das larvas, mostrando que a utilização das iscas com os fungos entomopatogênicos, pode afetar a viabilidade dos ovos, contribuindo assim para o controle da praga, na sua fase fundamental de desenvolvimento. As fêmeas são muito prolíferas, sendo que, de acordo com PRECETTI & TERÁN (1983) estas podem efetuar a oviposição durante todo o seu período de vida, que pode ser, segundo DEPASARI et alii (1987) de até 249 dias em condições de laboratório.

4.2. EXPERIMENTOS DE CAMPO

4.2.1. Eficiência de iscas tratadas com *Metarhizium anisopliae* isolado 259 sobre adultos de *Sphenophorus levis*

O número total de adultos de *S. levis* mortos nos tratamentos encontram-se na Tabela 25. Os números entre parênteses referem-se aos adultos comprovadamente mortos pelo *M. anisopliae*. Na Tabela 26 consta a análise da variância da porcentagem de mortalidade nos três períodos de observação, assim como a sua interação, sendo que nas Tabelas 27 e 28, são apresentadas as médias de mortalidade.

Tabela 25. Número de adultos de *S. levis* mortos pelo *M. anisopliae* e por outras causas, em 3 avaliações. Piracicaba, SP.

Tratamentos	Dias após a aplicação		
	8	12	16
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 259)	47 (37)	54 (35)	40 (29)
Testemunha	10 (1)	10 (2)	6 (0)

Tabela 26. Análise da variância entre a mortalidade de adultos de *S. levis* coletados em toletes de cana-de-açúcar, amostragens e sua interação. Piracicaba, SP.

CV	GL	SQ	QM	F	Nível de significância (%)
Blocos	4				
Tratamentos (TR)	1	12016,30	12016,30	245,47**	0,064
Resíduo (A)	4	195,80	48,95		
Amostragem (A)	2	298,44	149,22	2,56ns	10,73
Interação (TRxA)	2	192,84	96,42	1,65ns	22,10
Resíduo (B)	16	933,27	58,33		
Total	29	14113,03			

CV(A) = 17,84%

CV(B) = 33,73%

Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$

Tabela 27. Médias das porcentagens de mortalidade de adultos de *S. levis*, obtidas em iscas de cana-de-açúcar inoculadas com *M. anisopliae* e na testemunha. Piracicaba, SP.

Tratamentos	Médias transformadas	Médias originais
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 259)	42,65 a	46,45
Testemunha	2,63 b	0,21

CV = 17,84%

DMS = 11,76

Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$.

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 28. Médias das porcentagens de mortalidade de adultos de *S. levis*, coletados em toletes de cana-de-açúcar inoculados com *M. anisopliae*.

Dias após a inoculação	Médias transformadas	Médias originais
8	35,66 a	35,66
12	48,61 a	56,10
16	43,68 a	47,70

CV = 33,73%

DMS = 22,91

Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$.

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A representação gráfica das mortalidades obtidas em quatro amostragens realizadas no campo encontra-se na Figura 14. A mortalidade média acumulada em cada uma das amostragens de insetos coletados nas iscas, e mantidos no laboratório é apresentado na Figura 15.

Figura 14. Porcentagem de mortalidade de adultos de *S. levis*, quando coletados em iscas inoculadas com o isolado 259 do *M. anisopliae*. Piracicaba, SP.

Figura 15. Porcentagem de mortalidade média acumulada de adultos de *S. levis*, coletados aos 4, 8, 12 e 16 dias, em toletes de cana-de-açúcar inoculados com o isolado 259 de *M. anisopliae*. Piracicaba, SP.

Ao se analisar as mortalidades obtidas, encontrou-se que não houve diferença significativa no número de insetos coletados nas amostragens (Tabela 28), sendo que a média da mortalidade foi de 46,5% (Tabela 27). O isolado 259 do *M. anisopliae* apresentou uma boa persistência nas iscas, já que aos 20 dias após a sua inoculação, determinou-se uma mortalidade de 21% (Figura 14). A curva de mortalidade do inseto teve um crescimento até os 12 dias, a partir do qual foi diminuindo, mostrando assim, um comportamento quadrático ($F = 93,8^*$; $R^2 = 99\%$). A diminuição na mortalidade deveu-se, possivelmente, à perda da viabilidade do fungo nas iscas, sendo que esta depende de vários fatores tais como, temperatura, umidade, textura, fertilidade do solo e presença de organismos antagônicos (LINGG & DONALDSON, 1981; OLIVEIRA et alii, 1981; FERRON, 1977; 1983; FARGUES et alii, 1983 e GOTTWALD & TEDDERS 1984), sendo que o fator mais importante na perda de viabilidade dos conídios é a radiação solar (IGNOFFO et alii, 1976; ZIMMERMANN, 1982; ALVES et alii, 1984 e DAOUST & PEREIRA, 1986).

A aplicação de *M. anisopliae* em iscas protegidas com folhas de cana (Figura 6), pode ter favorecido a persistência deste patógeno por maior tempo. Estes resultados concordam com os obtidos por DAOUST & PEREIRA (1986) os quais encontraram que os conídios do *M. anisopliae* sobreviveram por mais tempo em tubérculos da cucurbitácea *Ceratosanthes hilariana*, quando protegidos da radiação solar.

Na Figura 15, pode-se observar uma mortali-

dade acumulada de 46,5% após 12 dias da coleta dos insetos nas diferentes amostragens. Este resultado quando comparado com a mortalidade obtida pela aplicação deste mesmo isolado no laboratório ($TL_{50}=14,9$), revela uma boa persistência deste fungo nas iscas em condições de campo. A mortalidade média (46,5%) obtida nestas condições foi semelhante à encontrada por GOTTWALD & TEDDERS (1983), os quais obtiveram 48,8% de mortalidade em adultos do bicudo *Curculio caryae*, quando estes entraram em contato, por caminharmento, com o fungo *M. anisopliae* aplicado em forma de pó na base de árvores de pecan.

4.2.2. Número de adultos capturados por isca

A análise de variância do número de insetos capturados nos 5 períodos de amostragem constam na Tabela 29, sendo que nas Tabelas 30 e 31 encontram-se os números de insetos capturados em 8 iscas, durante as 5 amostragens. A representação gráfica dos dados, encontra-se nas Figuras 16, 17 e 18.

Pelos resultados obtidos, determinou-se que não houve diferença na captura de *S. levis* nas iscas com e sem fungo, e sim nas diferentes épocas das amostragens. O número de insetos capturados, em ambos os casos, foi muito semelhante, diminuindo com o envelhecimento das iscas (Figura 16). Resultados semelhantes foram obtidos por PRECETTI &

TERÁN (1983). Estes dados mostram que as iscas tratadas com *M. anisopliae* não exercem um efeito repelente para os adultos de *S. levis* embora, em todas as amostragens, a captura dos insetos na testemunha foi maior, mas sem ser diferente significativamente, como é apresentado na Tabela 30.

Tabela 29. Análise da variância entre o número de adultos de *S. levis* coletados em toletes de cana-de-açúcar, amostragens e sua interação. Piracicaba, SP.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Nível de significância (%)
Blocos	1				
Tratamento (TR)	4	3,7972	3,7972	7,24ns	5,46
Resíduo (A)	4	2,0982	0,5246		
Amostragem (A)	4	55,1043	13,7761	45,23**	0,001
Interação (TRxA)	4	1,03722	0,2593	0,85ns	50,5
Resíduo (B)	32	9,7467	0,3046		
Total	49				

CV(A) = 6,34%

CV(B) = 10,81%

Dados transformados em $\sqrt{x}$

Tabela 30. Número médio de adultos de *S. levis* coletados em cinco períodos de amostragens, em toletes de cana-de-açúcar com e sem fungo nas condições de campo. Piracicaba, SP, abril de 1989.

Tratamento	Médias transformadas	Médias originais
<i>M. anisopliae</i> (Isolado 259)	4,95 a	24,52
Testemunha	5,47 a	29,96

CV = 6,34%

DMS = 0,57

Dados transformados em $\sqrt{\%}$

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

* Valor médio de 8 iscas em cinco períodos de amostragem.

Tabela 31. Número de adultos de *S. levis* capturados em toletes de cana-de-açúcar com e sem inoculação do de *M. anisopliae*. Piracicaba, SP, abril de 1989.

Dias após a inoculação	Testemunha		Isolado 259	
	Médias transformadas	Médias originais*	Médias transformadas	Médias originais*
4	6,86 a	47,06	6,05 a	36,62
8	5,32 b	28,30	4,90 b	23,98
12	5,74 b	32,94	5,55 ab	30,80
16	5,25 b	27,52	4,87 b	23,73
20	3,74 c	14,01	2,78 c	7,45

F = 45,23**

CV = 10,81%

DMS = 1,01

Dados transformados em $\sqrt{\%}$

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

* Valor médio de 8 iscas por amostragem.

Figura 16. Número de adultos de *S. levis* capturados em 40 toletes de cana-de-açúcar inoculados com *M. anisopliae* isolado 259, e não inoculados (testemunha) em cinco amostragens. Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril de 1989.

Figura 17. Número de adultos de *S. levis* capturados em 40 iscas de cana-de-açúcar (testemunha) em cinco amostragens. Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril de 1989.

Figura 18. Número de adultos de *S. levis* capturados em 40 iscas de cana-de-açúcar, inoculadas com *M. anisopliae* isolado 259, em cinco amostragens, Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril de 1989.

Pelos resultados que constam da Tabela 31, observa-se que tanto nas iscas inoculadas com o *M. anisopliae* quanto nas não inoculadas, a captura dos adultos de *S. levis* foi maior 4 dias após as mesmas terem sido colocadas no campo, sendo que, no caso da testemunha houve diferença significativa em relação às outras amostragens. Para as iscas inoculadas, esta diferença se deu entre os insetos coletados aos 4 dias, e os coletados aos 8, 16 e 20 dias.

Em ambos os casos (Figura 17, $F = 17,54^*$ e Figura 18, $F = 13,33^*$), obteve-se um aumento na captura de insetos a partir do dia 9 até o dia 14, após a colocação das iscas no canavial. Isto ocorreu, possivelmente, devido a um incremento na temperatura, nesse mesmo período, como mostra a Figura 19, já que, segundo DEGASPARI et alii (1987), há uma correlação altamente positiva entre a temperatura e a captura de adultos de *S. levis*, em iscas de cana-de-açúcar. A queda na captura de insetos, a partir desse período até o dia 20, deveu-se também ao envelhecimento das armadilhas de toletes, como foi discutido anteriormente.

Foi determinado que a substituição das iscas velhas pelas novas, no mesmo local onde permaneceram as iscas por 20 dias, produziu um aumento na captura de insetos (Figura 20), embora este tenha sido menor, quando comparado às capturas de insetos pelas primeiras iscas. Isto mostra que as iscas são capazes de diminuir a população de adultos de *S. levis* de uma determinada área, fato que pode ser

favorecido pela pequena dispersão desta praga, de acordo com os resultados obtidos por PRECETTI & TERÁN (1983) e DEGASPARI et alii (1987). Estes autores, mesmo achando valores discrepantes, informaram que a mobilidade deste inseto está associada ao ecossistema, mudança de temperatura e longevidade dos adultos.

De acordo com os resultados encontrados, abre-se a possibilidade de maiores estudos, sobretudo na área de epizootiologia, para se observar o comportamento da população de *S. levis*, quando são utilizadas iscas contaminadas com fungos entomopatôgenos.

Figura 19. Médias de temperatura do solo durante o período experimental (12/04/89 a 02/05/89). Usina Santa Helena, Piracicaba, SP.

Figura 20. Número de adultos de *S. levis* coletados em toletes de cana-de-açúcar, com e sem inoculação de *M. anisopliae*. Usina Santa Helena, Piracicaba, SP, abril/maio de 1989.

4.2.3. Patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* isolado 259 e *Beauveria bassiana* isolado 447 sobre adultos de *Sphenophorus levis*, quando aplicados em iscas de cana-de-açúcar

Embora o experimento tivesse sido planejado para se avaliar a eficiência dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, ocorreu uma contaminação dos toletes tratados com o

primeiro patógeno pelo fungo *Aspergillus* spp. (Figura 21), sendo impossível efetuar as duas últimas amostragens. Considerando que no experimento anterior, com este mesmo isolado, foram obtidos resultados satisfatórios, mostrando que a mortalidade não foi diferente significativamente nas três amostragens (Tabela 28), objetivo principal deste bioensaio, decidiu-se discutir somente os resultados referentes à mortalidade obtida com *B. bassiana*, isolado 447.

Figura 21. Tolete de cana-de-açúcar contaminado com *Aspergillus* spp. após 8 dias da inoculação com *M. anisopliae*.

Na Tabela 32 consta a análise de variância da porcentagem de mortalidade de adultos de *S. levís*, em três amostragens, assim como a sua interação. As médias da mortalidade estão contidas na Tabela 33, sendo que a representação gráfica encontra-se na Figura 22.

Tabela 32. Análise de variância entre a mortalidade de adultos de *S. levís*, coletados em toletes de cana-de-açúcar, amostragens e sua interação. Piracicaba, SP.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Nível de significância (%)
Blocos	2				
Tratamentos	1	20637,51	20637,51	160,72**	0,432
Resíduo (A)	2	256,97	128,48		
Amostragem (A)	2	288,95	144,47	0,77ns	50,23
TR x A	2	232,83	116,41	0,62ns	56,53
Resíduo (B)	8	1501,22	187,65		
Total	17	23244,68			

C.V.(A) = 14,047%

C.V.(B) = 29,40%

Tabela 33. Médias da porcentagem de mortalidade de adultos de *S. levis*, coletados em iscas de cana - de - açúcar, com e sem inoculação de *B. bassiana* isolado 447. Piracicaba, SP.

Tratamentos	Médias transformadas	Médias originais
<i>B. bassiana</i> (Isolado 447)	80,45 a	92,32
Testemunha	12,72 b	7,72
F = 160,62** CV = 14,05% DMS = 23,01		
Dados transformados em arco seno $\sqrt{\%}$		

Ao se analisar a mortalidade obtida, encontrou-se que não houve diferença significativa nas amostragens, nem entre a interação tratamento por amostragem. Observou-se também, uma diferença altamente significativa entre o isolado 447 e a testemunha, embora esta tenha apresentado 7,7% de mortalidade. Este fato foi devido, possivelmente, à contaminação com insetos provenientes das iscas tratadas, já que foram encontrados vários insetos mortos esporulados, próximos à testemunha. Também, nas amostragens realizadas antes da instalação do experimento no mesmo local determinou-se uma infecção natural de 0,7% dos adultos de *S. levis*.

Figura 22. Porcentagem de mortalidade de *S. levis* quando coletados em iscas inoculadas com *B. bassiana* isolado 447. Piracicaba, SP.

As porcentagens de mortalidade obtidas aos 4, 8 e 16 dias após colocação das iscas no canavial foram de 100; 91,2 e 85,7% respectivamente (Figura 22), mostrando assim, uma alta capacidade de persistência do fungo nas condições de campo.

Dentre os fatores mais importantes na persistência de um patógeno em um substrato, estão o efeito da radiação solar e a temperatura. A aplicação de *B. bassiana* em iscas protegidas com folhas de cana deve ter favorecido a persistência, sendo que a temperatura determinada durante o experimento (Figura 23) esteve na faixa ótima, que está entre 20 e 30°C (FERRON, 1978; FARGUES et alii, 1983 e LECUONA, 1986). Trabalhando com tubérculos da espécie silvestre de cucurbitácea *Cerathosanthus hilariana*, DAOUST & PEREIRA (1986) determinaram que os conídios de *B. bassiana* sobreviveram nestes tubérculos, quando protegidos da luz solar, por até 28 dias, com porcentagens de viabilidade próximas a 50%.

Os resultados encontrados neste experimento foram superiores aos de FERNANDES et alii (1984). Estes autores obtiveram mortalidades de 73, 42 e 7% aos 0, 7 e 14 dias para adultos de *Diabrotica speciosa*, alimentados com fatias de tubérculos de taiuiã inoculadas com uma suspensão de *B. bassiana*.

Comparando os resultados obtidos em ambos experimentos encontrou-se que o isolado 447 de *B. bassiana* foi mais patogênico do que o isolado 259 de *M. anisopliae*, além de

produzir maior número de conídios/inseto (Tabela 23). Testando a patogenicidade destas espécies, GOTTWALD & TEDDERS (1983) obtiveram mortalidade de 72 a 48% de adultos do bicudo *Curculio caryae*, quando entraram em contato por caminhamento, com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente, aplicados em forma de pó na base das árvores de pecan. Esta superioridade de *B. bassiana* também foi encontrada em várias espécies de pragas incluindo curculionídeos, por outros autores (MENEZES et alii, 1980; GOTTWALD & TEDDERS, 1982; 1983; TAYRA et alii, 1984 e FOSCHI & GRASSI, 1984).

Figura 23. Médias das temperaturas obtidas durante o período experimental (15/05/89 a 30/05/89) na Usina Santa Helena, Piracicaba, SP.

Os solos do agroecossistema da cana-de-açúcar, por sua temperatura moderada, umidade e matéria orgânica, podem representar um ambiente favorável para o desenvolvimento dos fungos entomopatôgenos *Beauveria* e *Metarhizium*. A utilização de toletes de cana, inoculados com estes fungos têm a grande vantagem de atrair adultos, sendo que na sua maioria são fêmeas segundo (DEGASPARI et alii, 1987), para um local com grande concentração de inóculo, protegido dos fatores abióticos, in desejáveis, favorecendo assim, o controle desta praga, com uma baixa quantidade do fungo por hectare.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa pode-se concluir que:

1. A metodologia utilizada nos bioensaios com *Beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* é adequada para selecionar os isolados mais patogênicos e virulentos para *Sphenophorus levis*.
2. Os isolados testados dos fungos *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *M. anisopliae* são patogênicos para *S. levis*.
3. A espécie *B. bassiana* é mais eficiente do que *B. brongniartii*, no controle de adultos de *S. levis*.
4. Os tempos letais de *S. levis* inoculados com *Beauveria* spp. e *M. anisopliae* variam conforme o isolado, dosagem e forma de aplicação.
5. As fêmeas são mais suscetíveis do que os machos, quando alimentadas com iscas de cana-de-açúcar tratadas com os patógenos.

6. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* afetam a sobrevivência dos ovos de *S. levis* quando colocados em iscas de cana-de-açúcar inoculadas com estes patógenos.

7. Em condições de campo, *B. bassiana* e *M. anisopliae* provocam mortalidades de *S. levis* superiores a 45%, até os 16 dias da inoculação dos toletes de cana-de-açúcar com estes patógenos.

8. O isolado 447 de *B. bassiana* é mais patogênico do que o isolado 259 de *M. anisopliae*, ao *S. levis* nas condições de campo.

9. A colocação de iscas de cana-de-açúcar diminui a população do inseto, em uma determinada área, sendo que a captura do mesmo decresce com o tempo, até o máximo de 20 dias, quando as iscas perdem a atratividade.

10. Não há diferença na mortalidade de adultos de *S. levis* capturados nas iscas inoculadas com *M. anisopliae* ao *B. bassiana*, nas amostragens aos 4, 8, 12 e 16 dias.

11. Para o controle de adultos de *S. levis*, nas condições da região de Piracicaba-SP, é recomendada a utilização do isolado 447 de *B. bassiana* aplicado em toletes de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, Menasha, 18: 264-67, 1925.
- ALESHINA, O.A. Composition and prospects for study of the entomopathogenic fungi of the URSS. Mikologiya I Fitopatologija, Leningrado, 12(6): 547-60, 1978. Apud Review of Applied Entomology, Series A, London, 68(1): 83 -4, 1980 (Resumo).
- ALVES, S.B. Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1982. 95p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B., coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986a. p.73-126.
- ALVES, S.B. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B., coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986b. p.311-23.
- ALVES, S.B. Epizootiologia. In: ALVES, S.B., coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986c. p.28-64.

- ALVES, S.B.; JARAMILLO, C.B.J.; SILVEIRA NETO, S. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill isolado 61 ao bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Rio de Janeiro, 1986. Resumos. Rio de Janeiro, Sociedade Entomológica do 1986. p.186.
- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L. Capacidade de sobrevivência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (isolado Eg) sobre cana-de-açúcar, nas condições de campo. O Solo, Piracicaba, 76: 39-42, 1984.
- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., através da análise fenética. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Porto Alegre, 15: 81-93, 1986.
- AYALA, J.L. & MONZÓN, S. Ensayo sobre diferentes dosis de *Beauveria bassiana* para el control del picudo negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (German). Centro Agrícola, Santa Clara, 4(2): 19-24, 1977.
- BADILLA, F.F. & ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado 447 ao gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12, Belo Horizonte, 1989. Resumos. Belo Horizonte, Sociedade Entomológica do Brasil, 1989. p.257.
- BARSON, G. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* as a pathogen of the larval stage of the elm bark beetle, *Scolytus scolytus*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 29: 361-6, 1977.

- BELL, J.V. & HAMALLE, R.J. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 15: 447-50, 1970.
- BORGES, V.E. Estudo de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin para controle de cigarrinhas-das-pastagens. Piracicaba, 1985. 99p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BROOME, J.R.; SIROKOWSKI, P.P.; NORMENT, B.R. A mechanism of pathogenicity of *Beauveria bassiana* in larvae of the imported fire ant, *Solenopsis richteri*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 28: 87-91, 1976.
- CAMARGO, L.M.P.C. de; BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B.P.B. Ocorrência do fungo *Beauveria* spp. patogênico ao "bicudo" do algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman) na região de Campinas, Estado de São Paulo. O Biológico, São Paulo, 50 (3): 65-81, 1984.
- CAMARGO, L.M.P.C. de; BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B.P.B. Susceptibilidade do "bicudo" do algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman) a ação dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. O Biológico, São Paulo, 51(8): 205-8, 1985.
- CHAMPLIN, F.R.; CHEUNG, P.Y.K.; PEKRUL, S.; SMITH, R.J.; BURTON, R.L.; GRULA, E.A. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. Journal of Economic Entomology, Menasha, 74: 617-21, 1981.

- COLES, R.B. & PINNOCK, D.E. Current status of the production and use of *Metarhizium anisopliae* for control of *Aphodius tasmaniae* in South Australia. In: AUSTRALIAN APPLIED ENTOMOLOGY RESEARCH CONFERENCE, 4., Adelaide, 1984. Proceedings. Apud Review of Applied Entomology, Series A, London, 73(5): 368, 1985. (Resumo).
- COTHRAN, W.R. & GYRISCO, G.G. An entomogenous fungus observed attacking alfalfa weevil adults in New York. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 59: 243-44, 1966.
- COUTINHO, J.L.B. & OLIVEIRA, J.V. de. Patogenicidade do isolado I-148Bb de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em relação a adultos de *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Col.: Curculionidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12., Belo Horizonte, 1989. Resumos. Belo Horizonte, Sociedade Entomológica do Brasil, 1989. p.219.
- DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W.; SOPER, R. Fungae diseases of cowpea pests in North Northeast and Central West Brasil. In: ANNUAL MEETING SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 16., New York, 1983. Proceedings. New York, Society for Invertebrate Pathology, 1983. p.42.
- DAOUST, R.A. & PEREIRA, R.M. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on beetle-attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. Environmental Entomology, College Park, 15: 1237-43, 1986.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, A.L.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. Experientia, Basel, 36: 293-41, 1980.

- DEGASPARI, N.; BOTELHO, P.S.M.; ALMEIDA, L.C.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae) em dieta artificial e no campo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 22(6): 553-8, 1987.
- DELATTRE, P. & JEAN-BART, A. Activités des champignons entomopathogènes (fungi imperfecti) sur les adultes de *Cosmopolites sordidus* Germ. (Coleoptera: Curculionidae). Turrialba, San José, 28(4): 287-93, 1978.
- DÍAZ, S.J. & GRILLO, R.H. Cepa de *Beauveria bassiana* Bals. (Vuillemin) como patógeno de *Cylas formicarius elegantulus* Summer. Centro Agrícola, Habana, 13(3): 94-5, 1986.
- DOBERSKI, J.W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus* to larvae and adults of *S. scolytus*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 37: 188-94, 1981.
- FARGUES, J. Étude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Fungi Imperfecti). Entomophaga, Paris, 17: 319-37, 1972.
- FARGUES, J.; REISINGER, O.; ROBERT, P.H.; AUBART, C. Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospore survival in soil. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 41: 131-142, 1983.

- FERNANDES, P.M. Influência da temperatura, umidade relativa do ar e dose na eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) sobre *Ceratoma arcuata* Oliv. (Col.: Chrysomelidae). Piracicaba, 1986. 68p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FERNANDES, P.M.; DAOUST, R.A.; MAGALHÃES, B.P.; YOKOYAMA, M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* aplicada sobre to-lhas de caupi (*Vigna unguiculata*) e tubérculos de *Cayaponia* sp. a *Diabrotica speciosa* e *Ceratomyia* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. Resumos. Londrina, Sociedade Entomológica do Brasil, 1984. p.174.
- FERNANDES, P.M.; LECUONA, R.E.; ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. à broca -do-café, *Hypo-tenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Ecossistema, Piracicaba, 10: 176-81, 1985.
- FERRON, R. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (fungi imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides ob-tectus* (Col.: Bruchidae). Entomophaga, Paris, 22(4): 393-6, 1977.
- FERRON, P. Biological control of insects pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, Palo Alto, 23: 409-42, 1978.
- FERRON, P. Artificial induction of an epizootic of *Beauveria brongniartii* among a population of *Melolontha melolontha*. Symbioses, La Minière, 15(1): 75-83, 1983.
- FINNEY, D.J. Probit analysis. New York, Cambridge Universi-ty Press, 1947. 255p.

- FOSCHI, S. & GRASSI, S. Results of treatment with *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuill and with *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. on *Ostrinia nubilalis* Hb. Difesa delle Piante, Bologna, 8(2): 301-8, 1984. Apud Review of Applied Entomology, Series A, London, 74(10): 1985 (Resumo).
- GOTTWALD, T.R.; TEDDERS, W.L. Studies on conidia release by the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from adult pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae) cadavers. Environmental Entomology, College Park, 11: 1274-9, 1982.
- GOTTWALD, T.R. & TEDDERS, W.L. Suppression of pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae) populations with entomopathogenic fungi. Environmental Entomology, College Park, 12: 471-4, 1983.
- GOTTWALD, T.R. & TEDDERS, W.L. Colonization transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. Environmental Entomology, College Park, 13(2): 557-60, 1984.
- GOYER, R.A. & BENJAMIN, D.M. Infection of a pine root weevil, *Hylobius rhizophagus*, by two muscardine fungi. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 64: 562, 1971.
- GUTIERREZ, S.G. Bioecologia de *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Col.: Curculionidae) e seu controle com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Piracicaba, 1986. 107p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").
- HADDAD, M.L. Análise de próbites. In: ALVES, S.B., coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986. p.374-83.

- HUSSEY, N.W. & TINSLEY, T.W. Impressions of insect pathology in the People's Republic of China. In: BURGESS, H.D., ed. Microbial control of pest and plant disease. New York, Academic Press, 1981. cap. 42, p.785-95.
- IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; GARCIA, C.; PINNEL, R.R. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. Environmental Entomology, College Park, 4: 765-8, 1975.,
- IGNOFFO, C.M.; MARSTON, N.L.; HOSTETTER, D.L.; PUTTLER, B.; BELL, J.V. Natural and induced epizootic of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 27: 191-8, 1976.
- JARAMILLO, C.B.J. & ALVES, S.B. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., isolado SPL-255 ao bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Rio de Janeiro, 1986. Resumos. Rio de Janeiro, Sociedade Entomológica do Brasil, 1986. p.199.
- KELLER, S. Bioassays with the fungus *Beauveria tenella* against adults cockchafers (*Melolontha melolontha* L.). Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, Zurich, 51(1): 13-9, 1978. Apud Review of Applied Entomology, Series A, London, 66(8): 515, 1978 (Resumo).
- LATCH, G.C.M. & FALION, R.E. Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control of *Oryctes rhinoceros*. Entomophaga, Paris, 21(1): 39-48, 1976.

- LECUONA, R.E. Controle microbiano de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brogniartii* (Sacc.) Petch. e vírus da granulose, e simulação dos efeitos da sua aplicação. Piracicaba, 1986. 169p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- LEVCHENKO, E.A. & MELASHCHENKO, T.V. Susceptibility on the stored grain weevil to microbiological preparations. Zashchita rasteniĩ, Moscow, 6: 39, 1979. Apud Review of Applied Entomology, Series A, London, 68(1): 78, 1980 (Resumo).
- LINGG, A.J. & DONALDSON, M.D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 38: 191-200, 1981.
- MACLEOD, D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 32(6): 818-90, 1954.
- MARTIGNONI, M.E. Producción masiva de patógenos de insectos. In: DeBACH, P. Control biológico de las plagas de insectos y malas hiervas. México, Continental, 1968. p.949.
- MARTINS, J.; SILVA, J.F. da; MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; FERREIRA, E. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Lissorhoptrus tibialis*, gorgulho aquático do arroz. Goiânia, EMBRAPA, 1986. 7p. (Pesquisa em andamento, 60).
- McLAUGHLIN, R.E. Infectivity tests with *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on *Anthonomus grandis* Boheman. Journal of Insect Pathology, New York, 1: 386-8, 1962.

- MENESES, C.R.; ECHEVERRIA, C.G.; MONZÓN, C.S. Efectividad de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en el control de *Lissorhoptus brevirostris* (Suftr.) (Coleoptera: Curculionidae). Centro Agrícola, Santa Clara, 7(1): 107-21, 1980.
- MESQUITA, A.L.M.; OLIVEIRA, A.A.R.; CORDEIRO, Z.J.M.; ALVES, E.J. Controle biológico de brocas da bananeira com fungos entomógenos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. Resumos. Londrina, Sociedade Entomológica do Brasil, 1984. p.177.
- MESSIAS, C.L.; ROBERTS, D.W.; GREFIG, A.T. Pyrolysis-gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: an aid strain identification. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 42: 393-6, 1983.
- MONTEIRO, R.T.R. & CUNHA, R.A. Um estudo fenético de linhagens de *Metarhizium*. Ciência e Cultura, São Paulo, 32(7): 682, 1980.
- OLIVEIRA, D.P.; CHAVES, G.M.; LOURES, E.G. Estudo comparativo da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes tipos de solo. Theobroma, Ilhéus, 11(4): 233-9, 1981.
- PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii* (= *Beauveria tenella*). Journal of Invertebrate Pathology, New York, 34: 71-9, 1979.
- PEKRUL, S. & GRULA, E.A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 34: 238-47, 1979.

- PRECETTI, A.A.C.M. & TERÁN, F.O. Gorgulhos da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 e *Metamasius hemipterus* (L., 1765) (Col.: Curculionidae). In: REUNIÃO TÉCNICA AGRO-NÔMICA, Piracicaba, 1983. Boletim Técnico, COPERSUCAR, São Paulo, 32-7, set. 1983.
- PRECETTI, A.A.C.M.; TERÁN, F.O.; HENRIQUE, B.C.; SANCHEZ, A.G. Distribuição geográfica, dispersão e aspectos de controle de *Sphenophorus levis*. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 13., Piracicaba, 1986. São Paulo, COPERSUCAR, 1986. p.147-51.
- PRECETTI, A.A.C.M.; WIENDL, F.M.; TERÁN, F.O.; SGRILLO, R.B. Estudos sobre a dispersão de adultos de *Sphenophorus levis* através de traçador radioativo. Boletim Técnico. COPERSUCAR, São Paulo, (23): 12-7, ago. 1983.
- PUPIN, A.M. & MESSIAS, C.L. Ácidos graxos em diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* como ajuda para identificação. Boletim do Grupo de Pesquisa em Controle Biológico, Brasília, 5: 12, 1984.
- QUINTELA, E.D. Estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillmin (Hyphomycetes) no solo e sua patogenicidade ao *Chalcodermus aemus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), praga do caupi. Piracicaba, 1986. 101p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ROBERTS, D.W. & YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGESS, H.D., ed. Microbial control of insects and mite. New York, Academic Press, 1971. p.125-49.

- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of extra-cellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 38: 1-3, 1981.
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 53: 25-31, 1989.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. San Francisco, W.H. Freeman, 1973. 573p.
- SOARES, G.G.; MARCHAL, M.; FERRON, P. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) at two different temperatures. Environmental Entomology, College Park, 12: 1887-91, 1983.
- SOKAL, R. Probit analysis on digital computer. Journal of Economic Entomology, Menasha, 51(5): 638-9, 1958.
- SOSA-GÓMEZ, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Estandarización, virulencia y actividade enzimática. CIRPON, Revista de Investigación, Tucumán, 1(3): 560-2, 1983.
- TAYRA, O.; FERNANDES, O.A.; BUSOLI, A.C.; ROCCIA, A.D. Controle microbiológico da broca da bananeira, *Cosmopolites sordidus* Germ., 1824 através de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sob condições de laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. Resumos. Londrina, Sociedade Entomológica do Brasil, 1984. p.197.

- TEDDERS, W.L.; WEAVER, D.J.; WEHUNT, E.J. Pecan weevil: suppression of larvae with the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and the nematode *Neoaplectana dutkyi*. Journal of Economic Entomology, Menasha, 66: 723-5, 1973.
- TEDDERS, W.L.; WEAVER, D.J.; WEHUNT, E.J.; GENTRY, C.R. Bioassays of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Neoaplectana carpocapsae* against larvae of the plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). Environmental Entomology, College Park, 11 (4): 901-4, 1982.
- TERÁN, F.O. Pragas da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B., coord. Cana-de-açúcar, cultivo e fertilização. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v.2, p.601-98.
- TERÁN, F.O. & PRECETTI, A.A.C.M. *Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus* como pragas na cana-de-açúcar. Boletim Técnico. COPERSUCAR, São Paulo, (18): 24-6, 1982.
- TONET, G.L. & REIS, E.M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos pragas de soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 14: 89-95, 1979.
- VAURIE, P. Revision on the genus *Sphenophorus* in South America. American Museum Novitates, New York, (2656): 1-30, Aug. 1978.
- VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; RIBEIRO, S.R. Controle biológico de *Metamasius hemipterus* (L., 1764) (Col.: Curculionidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 6., Campinas, 1980. Resumos. Campinas, Sociedade Brasileira de Entomologia, 1980. p.159.

- VEY, A. & FARGUES, J. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 30: 207-15, 1977.
- VILAS BOAS, A.M. Patogenicidade de *Beauveria* spp. e seu efeito associado ao inseticida monocrotophos sobre *Castnia lícus* (Drury, 1770) (Lep.: Castniidae). Piracicaba, 1986. 114p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- YADAVA, C.P.; SRIVASTAVA, R.P.; NAYAK, P. Susceptibility of rice stem borer to the entomogenous fungus, *Beauveria brongniartii*. Indian Journal of Entomology, New Delhi, 41(1): 100-2, 1979. Apud Review of Applied Entomology, Series A, London, 68(6): 364, 1980. (Resumo)
- ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). Conidial germ tubes and appressoria. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 15: 81-91, 1970.
- ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 40(1): 36-40, 1982.