INTERAÇÃO ENTRE O FUNGO Beauveria bassiana (BALS.) VUILL.,
E OS PRINCIPAIS PARASITÓIDES DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR,
Diatraea saccharalis (FABR., 1794).

MARIA ELISABETE GERALDI FOLEGATTI
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. DR. SÉRGIO BATISTA ALVES

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 1990

F663i Folegatti, Maria Elisabete Geraldi
Interação entre o fungo Beauveria bassiana (BALS.)
VUILL., e os principais parasitóides da broca da cana-
de-açúcar, Diatraea saccharalis (FABR., 1794). Pirac-
icaba, 1990.

131p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Broca da cana-de-açúcar - Controle biológico 2.
Cana-de-açúcar - Praga - Controle biológico 3. Fungo
entomopatogênico 4. Relação fungo-parasito I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 632.78

INTERAÇÃO ENTRE O FUNGO Beauveria bassiana (BALS.) VUILL.,
E OS PRINCIPAIS PARASITÓIDES DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR,
Diatraea saccharalis (FABR., 1794)

MARIA ELISABETE GERALDI FOLEGATTI

Aprovado em: 22.10.1990

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves	ESALQ/USP
Prof. Dr. Evoneo Berti Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Djair Vendramim	ESALQ/USP
Dr. Paulo Sérgio Machado Botelho	IAA/PLANALSUCAR
Dr. Enrico de Beni Arrigoni	COPERSUCAR

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves
Orientador

À minha mãe, LUIZA S. GERALDI

presença pura de simplicidade e humildade,

fonte viva de força e entusiasmo com que sempre me encorajou,

Às minhas irmãs, JUNE, DORA, JANE e JANETE GERALDI

e ao meu cunhado CELSO CROCOMO,

Ao meu esposo MARCOS V. FOLEGATTI,

e aos meus filhos LUCAS e LUIZA G. FOLEGATTI,

DEDICO.

*A todos os professores,
que contribuíram para a minha formação profissional,*

A MINHA GRATIDÃO.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Sérgio Batista Alves, Professor Associado do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), pelo incentivo e orientação na condução deste trabalho;

- Aos Docentes do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada;

- Ao programa CAPES-Demanda Social, pela concessão da Bolsa de Estudos para realização do curso de Doutorado em Entomologia;

- À Financiadora de Pesquisas do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Estudos para realização do trabalho de tese.

- Ao IAA-PLANALSUCAR, na pessoa do Dr. Paulo Sérgio M. Botelho e Sra. Rosana Maria Rossi Antognolli, pelo fornecimento e cuidados com o material biológico.

- À COPERSUCAR, na pessoa do Dr. Enrico De Beni Arrigoni, pelo fornecimento das pupas e adultos dos parasitóides.

- À Srt.^a Solange A. Vieira, pela colaboração nos trabalhos de laboratório.

- À Srta. Cibele Maria Galvani pelo cuidadoso trabalho de datilografia.

- À Dr.^a Myrian Tigano, pela realização das corridas eletroforéticas;

- À Srt.^a Sonia Piedade e Dr.^a Marinéia de Lara Haddad, pela orientação nas análises estatísticas e atenção dispensada;

- Ao Dr. Evoneo Berti Filho, pela colaboração na elaboração do Summary.

- Aos amigos Dileimar N. Machado, Massaru Yokoyama, Maria Tereza V. de Camargo, Daniel R. Sosa Gómez e Sérgio de Freitas, pelo companheirismo, cooperação e sugestões.

- A todos os companheiros do curso e do Laboratório de Patologia de Insetos da ESALQ e às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

	<u>página</u>
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMO	XVIII
SUMMARY	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Uso de <i>Beauveria</i> spp. como bioinseticida	4
2.2. Caracterização e seleção de isolados mais eficientes para o Controle Biológico	6
2.3. Atividade enzimica	7
2.4. Produção de conídios e crescimento de colônias	7
2.5. Dimensão dos conídios	8
2.6. Perfis eletroforéticos	8
2.7. Interação entre patógenos e inimigos naturais..	9
2.7.1. Interação entre fungos e inimigos naturais	11
2.7.2. Interação entre outros tipos de patógenos e inimigos naturais	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Material	26
3.1.1. Isolados do fungo <i>Beauveria</i> spp.	26
3.1.2. Meios de cultura	28

3.1.3. Dietas utilizadas	31
3.1.4. Insetos utilizados	32
3.2. Métodos	34
3.2.1. Bioensaio com <i>D.saccharalis</i> para obten- ção do LT-50 dos diferentes isolados...	34
3.2.2. Determinação da capacidade de produção de enzimas dos isolados de <i>B. bassiana</i> e <i>B.brongniartii</i>	35
3.2.3. Crescimento dos fungos e produção de conídios em meio BDA, nas temperaturas de 22, 26 e 30 °C	38
3.2.4. Determinação das dimensões dos conídi- os	39
3.2.5. Determinação dos zimogramas de alfa- esterases	39
3.2.6. Preparo das suspensões de conídios uti- lizados nos bioensaios	40
3.2.7. Experimento I. Bioensaios para avalia- ção da interação entre fungo-parasitói- des-praga	41
3.2.8. Bioensaios com pupas dos parasitóides da broca da cana-de-açúcar.....	45
3.2.8.1. Experimento II. Inoculação de <i>B.bassiana</i> em pupas de <i>C.</i> <i>flavipes</i>	46

3.2.8.2. Experimento III. Inoculação de <i>B.bassiana</i> em pupas de <i>M. minense</i> e <i>P.claripalpis</i>	47
3.2.8.3. Experimento IV. Inoculação de <i>B.bassiana</i> em adultos de <i>C. flavipes</i>	48
3.2.8.4. Experimento V. Inoculação de conídios de <i>B.bassiana</i> diretamente sobre adultos de <i>C. flavipes</i> recém-mortos.....	50
3.2.8.5. Experimento VI. Contato de adultos recém mortos de <i>C. flavipes</i> com a superfície de um recipiente contaminado por <i>B. bassiana</i>	51
3.2.8.6. Experimento VII. Inoculação de <i>B.bassiana</i> em adultos de <i>M.minense</i> e <i>P.claripalpis</i> ...	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Bioensaio com <i>D.saccharalis</i> para obtenção do LT-50 dos diferentes isolados	53
4.2. Determinação da capacidade de produção de enzimas dos isolados de <i>B. bassiana</i> e <i>B.brongniartii</i> ..	58
4.3. Crescimento dos fungos e produção de conídios em meio BDA, nas temperaturas de 22, 26 e 30° C	66

4.4. Determinação das dimensões dos conídios	72
4.5. Padrões eletroforéticos dos sistemas de alfa- esterases dos isolados de Beauveria spp.	74
4.6. Experimento I. Bioensaios para a avaliação da interação entre fungo-parasitóides-praga.....	77
4.7. Experimento II. Inoculação de B.bassiana em pupas de C.flavipes	100
4.8. Experimento III. Inoculação de B. bassiana em pupas de M.minense e P.claripalpis	102
4.9. Experimento IV. Inoculação de B. bassiana em adultos de C.flavipes	105
4.10. Experimento V. Inoculação de conídios de B. bassiana diretamente sobre adultos de C. flavipes recém mortos	107
4.11. Experimento VI. Contato de adultos recém - mortos de C.flavipes com a superfície de um recipiente contaminado por B. bassiana	107
4.12. Experimento VII. Inoculação de B.bassiana so- bre adultos de M.minense e P.claripalpis	109
5. CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>página</u>
1. Utilização de <i>B.bassiana</i> para o controle de pragas no Brasil.....	27
2. Relação dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. com seus respectivos hospedeiros originais e procedências	27
3. Porcentagens das mortalidades acumuladas de lagartas de 4 ínstar de <i>D.saccharalis</i> devidas aos diferentes isolados de <i>B.bassiana</i> e <i>B. brongniartii</i> , na dose de 10^7 conídios/ml	55
4. LT-50, intervalos de confiança (IC) e modelo matemático obtidos com a aplicação de sete isolados de <i>B.bassiana</i> e <i>B.brongniartii</i> para o controle de lagartas de 4 ínstar de <i>D.saccharalis</i> , na dosagem de 10^7 conídios/ml.....	56
5. Valores médios de diâmetro das colônias (cm), diâmetro do halo (cm) e área enzimica (AE, cm^2) de sete isolados de <i>B.bassiana</i> e <i>B. brongniartii</i> cultivados em meio especial para produção de amilase, após sete dias de desenvolvimento na temperatura de 26°C	59

Tabelapágina

6. Valores médios de diâmetro da colônia (cm), diâmetro do halo (cm) e presença de cristais de sete isolados de <i>B.bassiana</i> e <i>B. brongniartii</i> , cultivados em meio especial para produção de lipase, após sete dias de desenvolvimento na temperatura de 26 ° C.....	60
7. Valores médios de diâmetros das colônias(cm), diâmetro do halo(cm) e área enzimica (AE, cm ²) de sete isolados de <i>B. bassiana</i> e <i>B.brongniartii</i> cultivados em meio especial para produção de protease, pH=7, após cinco dias de desenvolvimento da temperatura de 26°C	62
8. Valores médios de diâmetro das colônias (cm) diâmetro do halo (cm) e área enzimica (AE, cm ²) de sete isolados de <i>B.bassiana</i> e <i>B.brongniartii</i> cultivados em meio especial para produção de protease, pH=10, após cinco dias de desenvolvimento na temperatura de 26°C.....	63
9. Produção de conídios por colônia (x10 ⁷), de isolados de <i>B.bassiana</i> , após seis dias de desenvolvimento em meio ABD, nas temperaturas de 22, 26 e 30 ° C.	68
10. Diâmetro médio das colônias (cm) de sete isolados de <i>B.bassiana</i> , após seis dias de desenvolvimento em meio ABD, nas temperaturas de 22, 26 e 30 ° C	69

Tabelapágina

11. Resultados da análise estatística para os valores médios da produção de conídios das colônias dos sete isolados testados nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	70
12. Resultados da análise estatística para diâmetro médio das colônias (cm) dos sete isolados testados nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	71
13. Dimensões dos conídios de diferentes isolados de <i>Beauveria</i> spp., obtidas em meio de cultura ABD mais antibiótico na temperatura de 26°C e fotofase de 16 horas (tamanho em μ)	73
14. Comportamento dos 7 isolados de <i>Beauveria</i> spp. quanto à patogenicidade, produção de exoenzimas, crescimento e esporulação	76
15. Porcentagem média de mortalidade de lagartas de <i>D.saccharalis</i> , submetidas ao tratamento com <i>B.bassiana</i> inoculadas com os parasitóides, e pela associação de ambos os agentes em diferentes temperaturas	78
16. Resultados da análise estatística para porcentagem média de mortalidade de lagartas de <i>D.saccharalis</i> submetidas ao tratamento com <i>B.bassiana</i> inoculadas com os parasitóides, e pela associação de ambos os agentes em diferentes temperaturas	79

Tabelapágina

17. Porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de <i>C.flavipes</i> em lagartas de <i>D.saccharalis</i> infectadas e não infectadas por <i>B.bassiana</i> nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	89
18. Resultados da análise estatística para porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de <i>C.flavipes</i> em lagartas de <i>D.saccharalis</i> infectadas e não infectadas por <i>B.bassiana</i> nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	90
19. Porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de <i>M.minense</i> em lagartas de <i>D.saccharalis</i> infectadas e não infectadas por <i>B.bassiana</i> nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	93
20. Resultados da análise estatística para porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de <i>M.minense</i> em lagartas de <i>D.saccharalis</i> infectadas e não infectadas por <i>B.bassiana</i> nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	94

Tabelapágina

21. Porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de <i>P.claripalpis</i> em lagartas de <i>D.saccharalis</i> infectadas e não infectadas por <i>B. bassiana</i> nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	97
22. Resultados da análise estatística para porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de <i>P.claripalpis</i> em lagartas de <i>D.saccharalis</i> infectadas e não infectadas por <i>B.bassiana</i> nas temperaturas de 22, 26 e 30°C	98
23. Efeito da exposição de pupas de <i>C.flavipes</i> ao fungo <i>B.bassiana</i> na dosagem de 10^7 conídios/ml	101
24. Efeito da exposição de pupas de <i>M.minense</i> ao fungo <i>B.bassiana</i> na dosagem de 10^7 conídios/ml.....	103
25. Efeito da exposição de pupas de <i>P.claripalpis</i> ao fungo <i>B. bassiana</i> na dosagem de 10^7 conídios/ml..	104
26. Efeito da exposição de adultos de <i>C.flavipes</i> ao fungo <i>B.bassiana</i> na dosagem de 10^7 conídios/ml.	106
27. Efeito da aplicação de conídios de <i>B. bassiana</i> sobre adultos recém-mortos de <i>C.flavipes</i>	108

Tabela

página

28. Efeito da exposição de adultos de <i>M.minense</i> ao fungo <i>B.bassiana</i> na dosagem de 10^7 conídios/ml.	110
29. Efeito da exposição de adultos de <i>P.claripalpis</i> ao fungo <i>B.bassiana</i> na dosagem de 10^7 conídi - os/ml	111

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>página</u>
1. Esquema das placas de bioensaio	35
2. Porcentagens de mortalidade total x tempo letal médio (LT-50) obtidos para os isolados do fungo <i>Beauveria</i> spp., testados contra <i>D.saccharalis</i> ..	57
3. Tempo letal médio (LT-50) x atividade enzimica para protease, pH=7 e amilase dos sete isolados do fungo <i>Beauveria</i> spp. testados contra <i>D.saccharalis</i>	65
4. Zimograma do sistema alfa-esterases de diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> (isolados 196, 197, 268 e 341) e <i>B. brongniartii</i> (isolados 210, 258 e 478)	75
5. Mortalidade de lagartas de <i>D.saccharalis</i> do Experimento I, devido à ação de <i>C.flavipes</i> (C_3) , de <i>B.bassiana</i> (C_2), pela associação dos dois agentes no mesmo tratamento (C_4), pela ação somente do parasitóide dentro da C_4 (PdC_4), pela ação somente do fungo dentro da C_4 (FdC_4) e ainda pela ação de ambos os agentes sobre o mesmo inseto, nas três fases e temperaturas estudadas.....	83

Figurapágina

6. Mortalidade de lagartas de *D.saccharalis* do Experimento I, devida à ação de *M.minense* (C_5), de *B.bassiana* (C_2), pela associação dos dois agentes no mesmo tratamento (C_6), pela ação somente do parasitóide dentro da C_6 (PdC_6), pela ação somente do fungo dentro da C_6 (FdC_6) e ainda pela ação de ambos os agentes sobre o mesmo inseto, nas três fases e temperaturas estudadas.. 86
7. Mortalidade de lagartas de *D.saccharalis* do Experimento I, devido à ação de *P. claripalpis* (C_7), de *B.bassiana* (C_2), pela associação dos dois agentes no mesmo tratamento (C_8), pela ação somente do parasitóide dentro da C_8 (PdC_8), pela ação somente do fungo dentro da C_8 (FdC_8) e ainda pela ação de ambos os agentes sobre o mesmo inseto, nas três fases e temperaturas estudadas 87

INTERAÇÃO ENTRE O FUNGO Beauveria bassiana (BALS.) VUILL.
E OS PRINCIPAIS PARASITÓIDES DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR
Diatraea saccharalis (FABR., 1794).

Autor: Maria Elisabete Geraldi Folegatti

Orientador: Sérgio Batista Alves

RESUMO

A presente pesquisa trata da influência de *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes), no complexo broca da cana-de-açúcar/parasitóides. Numa primeira etapa, foram caracterizados isolados do gênero *Beauveria*, pertencentes à mico-teca do laboratório de Patologia de Insetos da ESALQ/USP, para a seleção de um isolado, com melhores características para utilização nos bioensaios de interação. O isolado 196 de *B. bassiana* foi escolhido por ser de ocorrência natural na cultura da cana-de-açúcar e também por apresentar uma boa taxa de crescimento e esporulação, assim como patogenicidade elevada.

A partir dessa primeira etapa, experimentos foram conduzidos para determinar o estágio ou estágios nos quais os parasitóides *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), *Metagonistylum minense* e *Paratheresia claripalpis* (Diptera: Tachinidae) seriam suscetíveis ao fungo *B. bassiana*. Para verificar a natureza das interações, a praga foi submetida a 8 diferentes condições combinando-se a inoculação pe-

lo fungo com as inoculações pelos parasitóides em três fases do seu desenvolvimento, nas temperaturas de 22, 26 e 30°C. Os seguintes parâmetros foram avaliados: mortalidade da praga nas diversas condições estudadas, duração e viabilidade da fase imatura. Os resultados indicaram que a aplicação de *B. bassiana* sobre a broca da cana-de-açúcar parasitada foi mais eficiente do que a aplicação do fungo ou do parasitóide isoladamente. Por outro lado, a eficiência dos parasitóides foi diminuída na presença do fungo no mesmo hospedeiro, e a sobrevivência dos parasitóides adultos também foi afetada. Dessa forma, a utilização de *B. bassiana* no ecossistema da cana-de-açúcar poderia ser considerada um risco à sobrevivência dos parasitóides de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera : Pyralidae).

INTERACION BETWEEN THE FUNGUS Beauveria bassiana (BALS.)
VUILL, AND THE LARVAL PARASITIDS OF THE SUGARCANE BORER Diatraea
saccharalis (FABR., 1794)

Author: Maria Elisabete Geraldi Folegatti

Adviser: Dr. Sérgio Batista Alves

SUMMARY

The present research deals with the influence of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) in the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitoid complex. In the first stage *Beauveria* isolates from the fungi collection of the Insect Pathology Laboratory at ESALQ/USP, in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil, were characterized for selection of an isolate with the best characteristics for bioassays. The isolate *B. bassiana* 196 was chosen because of its natural occurrence in sugarcane plantations and also for its rapid growth rate and sporulation, as well as good pathogenicity. In the second stage, experiments were carried to determine which stage or stages of the parasitoids *Cotesia flavipes* (Hymenoptera, Braconidae), *Metagonistylum minense* and *Paratheresia claripalpis* (Diptera, Tachinidae) would be susceptible to the fungus. In order to assess the nature of these interactions, parasitized sugarcane borers, *D. saccharalis*, were subjected to the fungus at temperatures

of 22, 26 e 30°C. The following parameters were evaluated: sugarcane borer mortality under each different condition, duration and viability of the imature stages. Results indicated that the application of *B. bassiana* on parasitized sugarcane borer was more effective than the sole application of the fungus or of the parasitoids alone. However the efficiency of the parasitoids was lowered in the presence of the fungus in the same host, and the survival of adult parasitoids was also affected. Therefore the utilization of *B. bassiana* in a sugarcane ecosystem should be considered to have a potential risk to the survival of *D. saccharalis* parasitoids populations.

INTRODUÇÃO

A patologia de insetos iniciou-se no Brasil há ~~cerca~~ de meio século, com algumas referências feitas por fitopatologistas a respeito de patógenos atacando insetos. No trabalho de ROBBS (1962) encontra-se a referência dos primeiros pesquisadores, que fizeram esse tipo de observação, e também uma relação de doenças sobre insetos e ácaros da Baixada Fluminense. Em 1964 a ocorrência epizootica do *Metarhizium anisopliae* sobre a cigarrinha das folhas da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*, na região de Campos no Estado do Rio de Janeiro, despertou o interesse dos pesquisadores e, a partir do ano de 1969, esse fungo começou a ser produzido e utilizado nas regiões canavieiras do Nordeste do país, chegando a ser considerado um dos maiores projetos de controle microbiano com fungos existentes no mundo.

Posteriormente, iniciou-se no Centro Nacional de Pesquisa da soja (CNP_{SO}-EMBRAPA) um programa de pesquisa para a utilização do Vírus da Poliedrose Nuclear (NPV) de *Anticarsia gemmatilis* em substituição aos inseticidas químicos até então utilizados na cultura da soja.

Outros programas de controle microbiano de insetos vem sendo desenvolvidos no País , porém as pesquisas elaboradas, normalmente têm sido voltadas para aspectos relacionados com a eficiência desses patógenos no controle de pragas de importância econômica e as vantagens da substituição ou da associação de inseticidas convencionais com esses agentes.

Uma área do controle microbiano, pouco estudada no País, é a atuação de vários agentes de controle biológico em um mesmo agroecossistema. Assim, tão importante quanto a seletividade dos produtos químicos aos inimigos naturais presentes em um agroecossistema , torna-se relevante conhecer as interações que ocorrem entre patógenos e artrópodos benéficos, visto que essas interações podem ser favoráveis ao controle da praga ou podem ser desfavoráveis, podendo nesses casos gerar desequilíbrios biológicos.

Dessa forma, como o fungo *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) vem sendo intensivamente pesquisado no Brasil visando sua utilização sobre algumas pragas da cana-de-açúcar, sobre a broca da bananeira, e sobre alguns percevejos da soja, entre outros, e como todos esses insetos possuem seus parasitóides e predadores, é necessário que se estude as possíveis interações entre esses inimigos naturais. Assim, é importante saber se o patógeno aplicado de

forma inundativa, exerceria alguma influência sobre a fauna benéfica, principalmente para a cultura da cana-de-açúcar, na qual alguns parasitóides são produzidos e liberados massalmente. A utilização de um patógeno não seletivo aos inimigos naturais, poderia comprometer um programa de controle biológico da praga.

Assim, a presente pesquisa teve os seguintes objetivos: caracterizar isolados do gênero *Beauveria*, pertencentes à micoteca do laboratório de Patologia de Insetos da ESALQ-USP, para a seleção e utilização nos bioensaios de associação, determinar o estágio ou estágios nos quais os parasitóides *Cotesia flavipes* (Hymenoptera, Braconidae) *Metagospinistylum minense* e *Paratheresia claripalpis* (Diptera: Tachinidae) seriam suscetíveis ao fungo *B. bassiana* e se a introdução desse patógeno seria vantajosa no agroecossistema da cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Uso de Beauveria spp. como bioinseticida

Beauveria é um Gênero de fungo entomopatogênico que infecta cerca de 200 espécies de insetos de diferentes Ordens (ALVES, 1986a). MACLEOD (1954) descreve-o como sendo o isolado fúngico mais comumente encontrado em insetos mortos na natureza.

O emprego deste entomopatógeno , em grande escala, foi iniciado na União Soviética em 1970, para o controle do besouro do Colorado, Leptinotarsa decemlineata(Say) devido ao desenvolvimento de processos de produção em massa e consequentemente a formulação de um micoinseticida denominado Boverin (SAMSINAKOVA, 1966 e IGNOFFO, 1975). A URSS e o Japão são os países que atualmente empregam esse fungo em escala comercial (KHACHATOURIANS, 1986). No entanto, em outros países como Canadá, França, Alemanha, China, Tchecoslováquia e EUA, esse patógeno também tem sido muito estudado e empregado no controle microbiano de insetos, utilizando-se diferentes estratégias.

No Brasil, muitos pesquisadores vêm estudando as possibilidades do emprego de *Beauveria bassiana* para o controle de diferentes pragas em algumas culturas, (Tabela 1).

Tabela 1. Utilização de *B.bassiana* para o controle de pragas no Brasil.

Espécie	Cultura	Tipo de Aplicação	Pesquisadores
<i>Anthonomus grandis</i>	algodoeiro	L	ALVES et alii, 1986
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	-	L	ALVES & SOGA GÓMEZ, 1983
<i>Atta sexdens piriventris</i>	-	L	DIEHL-FLEIGH & SILVA, 1986
<i>Atta sexdens piriventris</i>	-	L	LUCCHESI, 1987
<i>Brassolis sophorae</i>	palmeiras	L	HABIB & ANDRADE, 1977
<i>Castnia licus</i>	cana-de-açúcar	LC	MARQUES et alii, 1986
<i>Castnia licus</i>	cana-de-açúcar	LC	VILLAS BOAS, 1986
<i>Chalcodeinus bimaculatus</i>	caupi	L	QUINTELA et alii, 1987
<i>Cerotoma arcuata</i>	-	L	LORD et alii, 1987
<i>Diabrotica speciosa</i>	feijoeiro	L	CARVALHO & SILVA, 1984
<i>Diabrotica speciosa</i>	caupi	LC	FERNANDES et alii, 1984
<i>Diatraea saccharalis</i>	cana-de-açúcar	LC	ALVES et alii, 1985
<i>Diatraea saccharalis</i>	cana-de-açúcar	LC	LECUONA, 1986
<i>Deois flavopicta</i>	pastagem	C	BARBOSA et alii, 1984
<i>Hypothenemus hampei</i>	café	L	FERNANDES et alii, 1986
<i>Nezara viridula</i>	soja	L	LEITE et alii, 1987
<i>Piezodorus guildinii</i>	soja	L	TONET & REIS, 1979
<i>Solenopsis invicta</i> e <i>S. saevissima</i>	-	LC	ALVES et alii, 1988
<i>Spodoptera littoralis</i>	-	L	EL-KADI & HAMED, 1983
<i>Tibraca limbativentris</i>	arroz	C	MARTINS et alii, 1987

L - Laboratório

C - Campo

Muitos desses autores concluíram que *Beauveria bassiana* oferece possibilidades reais no controle de pragas de interesse agrônômico, também experimentos com pragas urbanas, como formigas, cupins de madeira e outros, têm demonstrado essa mesma possibilidade.

2.2. Caracterização e seleção de isolados mais eficientes para o controle biológico

Entre as técnicas de caracterização de fungos entomopatogênicos as características culturais e morfológicas, a serologia, eletroforese, cromatografia, especificidade, e virulência, têm sido mencionadas e utilizadas pelos pesquisadores (ALVES, 1982; SOSA GÓMEZ & ALVES, 1983; SOSA GÓMEZ et alii, 1984; BORGES, 1985 e ALVES, 1986a). As diferentes técnicas citadas permitem observar a variabilidade natural da espécie ou espécies a serem estudadas e assim selecionar os isolados mais eficientes para o controle biológico. Segundo ALVES (1986a) um método de caracterização de linhagens de *Metarhizium anisopliae*, com o citado intuito, pode ser realizado obtendo-se um perfil biológico e bioquímico dos isolados. Nesse perfil são considerados: comprimento dos conídios, taxa de potência dos isolados sobre insetos, produção de conídios e crescimento de colônias, assim como atividade enzimática e resistência à luz ultra violeta.

2.3. Atividade enzimica

Empregando-se meios contendo substratos para produção de exoenzimas como lipase, amilase e protease, através das diferenças dos diâmetros dos halos formados alguns aspectos relativos a capacidade de infecção e patogenicidade das diferentes linhagens podem ser discutidos, porém como relatado por SOSA GÓMES (1990), de uma maneira geral, as informações obtidas pelos autores não coincidem quanto a importância de uma determinada enzima no processo da patogênese.

2.4. Produção de conídios e crescimento de colônias

MONTEIRO (1988) analisou o comportamento de diferentes isolados de *M.anisopliae*, *B. bassiana* e *P. marguandii* em diferentes meios de cultura observando variações no crescimento e esporulação entre espécies, entre isolados da mesma espécie e entre os meios de cultura testados.

PACCOLA-MEIRELLES (1988), estudando alguns isolados de *B.bassiana* em diferentes meios de cultura, também observou diferenças significativas, sendo que os isolados 196, 256, 252 e 61 foram os que esporularam melhor em meio BDA, enquanto que o isolado 246 produziu mais conídios em M.M. A autora mencionou, ainda, que o crescimento radial é ca-

racterístico de cada isolado, pois eles responderam distintamente quando cultivados em um mesmo meio.

2.5. Dimensão dos conídios

Segundo SAMSON (1981) a diferenciação das duas espécies de *Beauveria* que atacam mais frequentemente os insetos pode ser feita, entre outras características, pela forma e tamanho dos conídios. A espécie *B. bassiana* é mencionada como tendo conídios globosos ou subglobosos com 2,0 a 3,0 x 2,0 a 2,5 micrometros, enquanto a espécie *B. brongniartii* possui conídios elipsóides com 2,0 a 3,0 x 1,5 a 2,5 micrometros de diâmetro. MAC LEOD (1954) citou como dimensões médias 2,4 micrometros para a espécie *B. bassiana* e para a espécie *B. brongniartii* dimensões variando entre 2 a 6 por 1,5 a 3 micrometros.

2.6. Perfís eletroforéticos

TIGANO (1985) estudando alguns isolados de *Beauveria bassiana* quanto a sua variabilidade genética, observou um polimorfismo ao nível das alfa-esterases pelo uso de técnicas eletroforéticas e segundo a autora essas técnicas acusam diferenças entre isolados morfológicamente seme-

lhantes, com facilidade, segurança e rapidez nos resultados. PACCOLA-MEIRELLES (1988), analisando os padrões eletroforéticos para esterases obtidos dos isolados 61, 196, 246, 252 e 256 de *B. bassiana*, observou que de forma geral os isolados apresentaram padrões distintos no número e mobilidade de bandas e que esta variabilidade observada permitiu, ao lado de outras técnicas, caracterizar e diferenciar os isolados de *B. bassiana*, agrupando-os de acordo com suas similaridades. A autora observou, ainda que a variabilidade encontrada era esperada, uma vez que aqueles isolados eram oriundos de diferentes hospedeiros em distantes regiões do país. Da mesma forma, SOSA GÓMEZ (1990), estudando a variabilidade genética de *Beauveria* sp., concluiu que os isolados provenientes de diferentes regiões diferiram em seus padrões eletroforéticos.

2.7. Interação entre patógenos e inimigos naturais

Quando se considera a hipótese da utilização de patógenos para o controle de pragas empregando-se, como para o caso de fungos, quantidades maciças de esporos no campo, há a necessidade de se fazer um estudo prévio, entre outros fatores, dos efeitos sobre a mortalidade da praga, dos inimigos naturais e possíveis efeitos sobre o agroecossistema, principalmente quando se trata de fungos, com largo espectro de hospedeiros como *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

As interações existentes entre os diversos agentes de controle natural, como parasitóides, predadores e microorganismos que ocorrem naturalmente em campos cultivados ou são empregados para o controle de um determinado inseto praga, foram revisadas por diversos autores (JAQUES & MORRIS, 1981; VERENINI, 1983; VAIZER, 1983 e MILNER, 1986).

Segundo JAQUES & MORRIS (1981), alguns entomopatógenos podem prejudicar artrópodos parasitóides das seguintes maneiras: pela infecção do parasitóide, pela produção de fatores tóxicos ou, indiretamente, pela morte do hospedeiro antes do parasitóide poder completar seu desenvolvimento. Também a redução da eficiência ou da longevidade do parasitóide pode ocorrer quando da interação com entomopatógenos. Porém, em algumas relações entre patógenos e parasitóides existem aspectos benéficos que contribuem para um aumento no controle do inseto praga, como por exemplo, cita-se a disseminação de patógenos pelo ovipositor de alguns parasitóides e por predadores através de partes contaminadas de seu corpo, como tarsos e aparelho bucal que entram em contato com o hospedeiro.

Outro aspecto interessante seria um aumento da suscetibilidade dos hospedeiros em relação a patógenos, devido ao estresse causado pela presença de larvas de parasitóides em seu interior (TANADA, 1975).

Entre os principais entomopatógenos utilizados no controle microbiano estão os nematóides, fungos, bactérias, vírus e protozoários e para cada um desses agentes, existe um tipo de relação diferente com parasitóides e predadores.

2.7.1. Interação entre fungos e inimigos naturais

Com relação as interações que ocorrem entre parasitóides e fungos entomopatogênicos não existem muitas referências bibliográficas mas, as que existem, revelam aspectos interessantes da influência recíproca. Comparando com os outros tipos de patógenos poder-se-ia dizer que existe a mesma complexidade de relações, porém ao contrário dos vírus, alguns fungos de insetos não possuem uma elevada especificidade pelo hospedeiro e essa característica representa riscos para o seu uso como instrumento de controle de pragas no campo.

Entre os aspectos revelados por pesquisadores sobre a influência recíproca fungo-parasitóide está o fato dos parasitóides também serem capazes de transmitir fungos entomopatogênicos (Voukossovitch¹, citado por VERENINI, 1983).

¹Voukossovitch, P. 1925 - Contribution à l'étude d'un champignon entomophyte *Spicaria farinosa* (Fries) var. *verticilloides* Fron. - Ann. Inst. Nat. Rech. Agron., 2: 73-106.

Quando esses dois agentes estão igualmente presentes na população de um inseto praga, ocasionalmente o parasitóide pode completar seu desenvolvimento em um hospedeiro que mostra sintomas de infecção fúngica (SMITH et alii, 1976 e FOLEGATTI & ALVES, 1987).

Como os fungos são um dos entomopatógenos mais influenciados pelas condições climáticas, esse fator também deve ser analisado quando se estudam as interações entre fungos e parasitóides no meio ambiente. BERISFORD & TSAO (1975), estudando os fatores bióticos de controle de *Thyridopteryx ephemeraeformis* nos EUA, durante 3 anos consecutivos, observaram que existia uma correlação inversa entre o nível de doenças fúngicas e parasitismo em populações larvais de *T. ephemeraeformis*, sendo que os fungos contribuíram mais eficientemente para a mortalidade das larvas durante os períodos úmidos e os parasitóides foram predominantes durante os períodos secos, não ocorrendo, portanto, interferência na atuação de um agente sobre a atuação do outro.

Dessa forma, o fungo *Verticillium lecanii*, um patógeno que ocorre freqüentemente sobre pulgões e cochonilhas nas regiões tropicais e subtropicais, segundo

Barson¹ e Ekbon², citados por HARPER & HUANG (1986), é bastante afetado pela temperatura e umidade e, é mais eficiente no controle de insetos quando a umidade é bastante elevada. Por esse motivo, esse fungo tem sido utilizado em condições de estufa, para o controle de pulgões e mosca branca na Inglaterra e em campos irrigados no Canadá, em associação com o parasitóide *Encarsia formosa*.

HALL (1982) relatou que o fungo *V. lecanii* e o parasitóide *Encarsia formosa* podem co-existir na mesma cultura, e que apesar de ocasionalmente um adulto do parasitóide ter sido encontrado morto pelo fungo, nenhuma larva apresentou sintomas da doença. HARPER & HUANG (1986) fizeram uma avaliação do fungo *V. lecanii* como agente de controle de alguns insetos, entre eles vários afídeos, um coccinelídeo e um nabídeo, concluindo que apesar do fungo possuir um grande potencial para o uso em programas de manejo integrado de pragas, deve ser usado com cautela pois ele demonstrou ser patogênico ao predador *Nabis alternatus*.

¹Barson, G. 1976. Laboratory studies on the fungus *Verticillium lecanii*, a larval pathogen of the elm bark beetle. Ann. Appl. Biol. 83: 207-214.

²Ekbon, B.S. 1981. Humidity requirements and storage of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* for use in greenhouse. Ann. Entomol. Fenn. 47. 61-62.

Ao contrário de alguns fungos entomopatogênicos, as espécies do Gênero *Aschersonia* são altamente específicas, pois apenas os aleirodídeos e coccídeos são conhecidos hospedeiros desse gênero. Além disso, ele é pouco influenciado pelas condições climáticas, necessitando apenas de um pequeno período de alta umidade para sua germinação e penetração no corpo do inseto e essa alta umidade geralmente ocorre durante a noite dentro das casas de vegetação devido a água que evapora da massa foliar ali presente. Esse aspecto favorável, no entanto, contrasta com outro que pode ser considerado desfavorável; que é a dificuldade de se tornar epizoótico sob condições de casa de vegetação, o que implica na necessidade de se fazer aplicações repetidas, utilizando técnicas muito precisas (RAMAKERS, 1983 e RAMAKERS & SAMSON, 1984). Em condições de campo, as chuvas funcionam como agente de disseminação favorecendo os processos epizoóticos. Esse fungo não afeta a relação entre o número de *Trialeurodes vaporariorum* e seu parasitóide *Encarsia formosa* (RAMAKERS & SAMSON, 1984). LANDA (1984), por sua vez, relatou que a combinação do parasitóide *E. formosa* com o fungo *Aschersonia* sobre *T. vaporariorum* resultou em um melhor controle devido aos diferentes mecanismos usados pelos dois agentes, isto é, o parasitóide não coloca ovos em larvas infectadas do hospedeiro, e o fungo só coloniza os dois primeiros instares larvais os quais não são parasitados, havendo portanto uma complementação de funções.

O fungo *Hirsutella thompsonii* é um patógeno específico de ácaros, ocorrendo principalmente sobre eriofiídeos e tetraniquídeos cujas epizootias naturais estão diretamente correlacionadas com épocas chuvosas e com elevada densidade de hospedeiros. A umidade relativa favorável à infecção está entre 90 a 100%. McCOY (1981) relatou que, apesar dos hospedeiros de *Hirsutella* serem limitados à ordem Acarina, o ácaro predador *Typhlodromalus peregrinus* pode ser infectado por esse fungo.

SOSA GÓMEZ et alii (1985) comprovaram a especificidade de *H. thompsonii* ao ácaro da falsa ferrugem dos citros *Phyllocoptruta oleivora*, testando diferentes métodos de inoculação. Tanto as larvas quanto os adultos dos coccinelídeos *Coccidophilus citricola* e *Lindorus lophanthae* não apresentaram sintomas de infecção, embora os autores mencionem que possíveis alterações em outros parâmetros biológicos do inseto não tenham sido estudados.

O gênero *Entomophthora* ocorre mais comumente em insetos das ordens Homoptera, Diptera, Orthoptera e Lepidoptera. Para estudar a compatibilidade de duas espécies de fungos do gênero *Zoophthora* com o parasitóide *Microctonus colesi* que ocorrem naturalmente em campos de alfafa controlando *Hypera postica*, LOAN (1981) utilizou o fungicida captafol. O autor observou que o tratamento com o fungicida re-

duziu a infecção em 88 a 99%, e também que, nas parcelas tratadas, 77% das larvas de *H.postica* foram parasitadas por *M.colesi*, quando comparadas com as parcelas não tratadas. Esse aumento na porcentagem de emergência se deve provavelmente ao fato do parasitóide atacar o estágio larval, e dessa forma, competir com o fungo, de maneira direta, pelo mesmo hospedeiro.

MILNER et alii (1984), estudando a suscetibilidade de afídeos atacados por iquineumonídeos a fungos patogênicos da ordem Entomophthorales, *Zoophtora radicans* e *Erynia neoaphidis* sob condições constantes de laboratório na Austrália, relatou que para as duas combinações, parasitóide - patógeno - praga estudadas, os resultados foram similares mostrando que os parasitóides não foram infectados pelos patógenos e que os dois inimigos naturais atuam independentemente. A doença por desenvolver-se rapidamente, compete com os parasitóides nos primeiros ínstares, mas as larvas mais maduras são capazes de completar seu desenvolvimento. Alguns adultos dos parasitóides emergem mesmo quando os dois inimigos são aplicados simultaneamente. Dessa forma, o autor concluiu que é improvável que os parasitóides sejam eliminados das populações de afídeos no campo durante epizootias severas, ainda que reduções dramáticas na abundância desses parasitóides tenham sido documentadas. O autor relatou ainda que é improvável que os fungos Entomophthorales possam ser

transmitidos pelo ovipositor dos parasitóides. No entanto, é possível que os parasitóides tenham seu tamanho e consequentemente sua fecundidade reduzidos. O autor acredita também ser improvável que as fêmeas dos parasitóides sejam capazes de distinguir entre hospedeiros saudáveis ou infectados, devido ao fato de que os sintomas da doença são observados só muito próximo à morte do hospedeiro.

BROBYN et alii (1988) estudaram o efeito da infecção do afídeo *Metopolophium dirhodum* pelo fungo *Erynia neoaphidis* sobre a taxa de oviposição do himenóptero parasitóide *Aphidius rhopalosiphi* e concluíram que essa taxa decresce com o aumento do período decorrido desde a obtenção da infecção pelo hospedeiro, e que o parasitóide não tenta ovipositar em afídeos recém mortos pelo fungo. Esses autores citaram também o trabalho de Powell et alii¹, para a mesma associação de patógeno - parasitóide - praga onde se conclui que a larva do parasitóide dificilmente consegue se desenvolver quando a infecção pelo fungo ocorre em um hospedeiro que foi parasitado nos três dias anteriores, mas que a infecção, após esse período, tem progressivamente, menos efeito sobre o desenvolvimento do parasitóide. Os mesmos

¹Powell, W.; Wilding, N.; Brobyn, P.J. & Clark, S.J. 1986. Interference between parasitoids (Hym; Aphidiidae) and fungi (Entomophthorales) attacking cereal aphids. Entomophaga, 31, 293-302.

autores , comentaram ainda sobre a semelhança do mecanismo que os parasitóides possuem para evitar o superparasitismo, intra ou interespecífico, com o mecanismo que eles parecem ter desenvolvido para evitar a oviposição em hospedeiros infectados pelo fungo. O parasitóide pode discriminar entre hospedeiros infectados ou não pelo fungo, porém, apenas quando essa infecção já está bastante desenvolvida.

Nomuraea rileyi é um dos fungos patogênicos a insetos cuja especificidade não é muito grande. ALVES (1986a) relatou que esse patógeno ocorre em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleoptera, Orthoptera e Lepidoptera e que cerca de 90% dos hospedeiros de *N.rileyi* pertencem a essa última ordem. No Brasil, ele é bastante frequente nos campos de cultivo da soja promovendo o controle natural de *Anticarsia gemmatalis*. Essas epizootias junto com o NPV de *Anticarsia* tem contribuído para a diminuição do uso de defensivos na cultura. No entanto, BURLEIGH (1975) relatou que parasitismo por *Microplites croceipes* no campo pode ser reduzido pela interferência de uma alta taxa de infecção pelo *Nomuraea rileyi*, que durante a competição pelo mesmo hospedeiro consegue causar a sua morte mais rapidamente. Por outro lado, PHADKE & RAO (1978) relataram que, em seus experimentos, *N.rileyi* mostrou-se não patogênico ao parasitóide de ovos *Telenomus proditor* usado no controle biológico de *Achoea janata* uma importante praga da mamona. Foram utiliza-

dos dois tipos de inoculação: através da aplicação de uma suspensão aquosa de esporos do fungo diretamente sobre os ovos de *A. janata* parasitados, e também através da liberação de adultos dos parasitóides em recipientes pulverizados com esporos do fungo.

KING & BELL (1978), investigando alguns aspectos da interação entre o parasitóide *M. croceipes* e *N. rileyi* sobre lagartas de *Heliothis zea*, concluíram que poderia ocorrer uma diminuição da taxa de parasitismo normal dependendo da fase em que se encontrava a larva do parasitóide por ocasião da infecção. Observaram também que, quando o fungo foi aplicado ao mesmo tempo ou após o ataque do parasitóide, houve um aumento na taxa de infecção pelo fungo, indicando que *M. croceipes* predispõe o hospedeiro à ação do patógeno.

Segundo ALVES (1986a), o primeiro trabalho de controle microbiano foi realizado por Metschnikoff em 1879, que aplicou o fungo *Metarhizium anisopliae* para o controle de larvas de um curculionídeo, importante praga da beterraba, e desde então esse fungo vem sendo estudado sobre muitas espécies de insetos. Acredita-se que esse patógeno ocorra naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens. Com relação à sua ação sobre parasitos e predadores, praticamente nada foi constatado. Além de poucas

observações de sua ocorrência sobre esses artrópodos benéficos (ALVES, 1986a e ROCKWOOD, 1950), existe o trabalho de FOLEGATTI & ALVES (1987) que estudaram a patogenicidade do *M. anisopliae* sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* parasitadas por *Cotesia flavipes*, *Metagonistylum minense* e *Paratheresia claripalpis*. Esses autores observaram que os parasitóides não conseguiram completar seu desenvolvimento em lagartas de *D. saccharalis* quando o fungo foi imediatamente inoculado no mesmo hospedeiro, ou em alguns casos, até o terceiro dia do parasitismo. Em outro trabalho, FOLEGATTI et alii (1990) concluíram que o fungo *M. anisopliae* não foi patogênico para as pupas de *A. flavipes*, tendo sido comprovada sua patogenicidade para adultos apenas nas condições de alto potencial de inóculo e principalmente na temperatura de 22°C.

O gênero *Beauveria* é comumente encontrado infectando insetos. O patógeno ocorre em condições naturais enzoóticamente ou provocando epizootias em algumas espécies de insetos pragas. Por sua vasta distribuição e frequência natural, tem sido largamente estudado e empregado experimental e, em alguns casos, comercialmente. Porém, pouco se tem registrado sobre sua especificidade com relação a artrópodos benéficos. EL-SUFTY & FUHRER (1981), estudando essa especificidade, demonstraram que o parasitismo de *Apanteles glomeratus* favorece a penetração do fungo *B. bassiana* através da cutícula do último estágio larval de *Pieris brassicae*.

Por outro lado, para a sua autoproteção, na ocorrência da infecção, o parasitóide secreta um fator antifúngico na hemolinfa do hospedeiro, que retarda a multiplicação dos blastóporos pela hifa do fungo no hemocele, possibilitando que uma grande parte dos parasitóides escapem a infecção letal. EL-SUFTY & FUHRER (1985) também verificaram esse tipo de interação entre o parasitóide *Ascogaster quadridentatus* e o fungo *B. bassiana* no interior de lagartas de *Cydia pomonella*.

MAGALHÃES et alii (1988) verificaram que as espécies predadoras *Coleomegilla maculata* e *Eriopsis connexa* foram mais suscetíveis ao fungo *B. bassiana* que *Ceratomyia arcuata* quando os conídios foram aplicados diretamente sobre os insetos. Porém, em aplicações efetuadas via foliar, como acredita-se que seja a forma predominante de exposição sob condições de campo, *C. arcuata* foi o inseto que apresentou maior índice de infecção, seguido por *E. connexa*, e *C. maculata* que não foi infectado.

2.7.2. Interação entre outros tipos de patógenos e inimigos naturais.

As interações entre parasitóides ou predadores com patógenos como bactérias, protozoários e vírus, têm sido bastante estudadas e portanto estão melhor elucidadas atualmente. Dessa forma, para asso-

ciações parasitóide ou predadores com bactérias tanto são citados efeitos antagônicos quanto sinérgicos (JAQUES, 1965: WESELOH et alii, 1983 e WOLLAM & YENDOL, 1976).

A redução de populações de parasitóides e predadores tem sido atribuída a *Bacillus thuringiensis* (B.t.) por alguns pesquisadores, porém eles admitem que a redução da população da praga também possa ser responsável por esse declínio. THOMS & WHATSON (1986) concluíram que B.t. aplicado no campo, poderia afetar de maneira adversa mais os estágios imaturos do que os adultos devido a morte prematura do hospedeiro. No entanto, a redução da longevidade de parasitóides pela ingestão de esporos de B.t. foi relatada por DUNBAR & JOHNSON (1975).

HASSAN & KRIEG (1975) relataram que *Trichogramma cocoeciae* exposto a uma suspensão de B.t. reteve a sua habilidade normal de parasitar os ovos de *Sitotroga cerealella*, demonstrando uma boa tolerância as preparações comerciais à base de B.t.: Thuricide-HP, Dip-el e Bactospeine. Por outro lado, Salamada et alii¹ citados por VERE-

¹ Salamada, H.S.; Zaki, F.N.; Sharaby, A.F., 1982. Effect of *Bacillus thuringiensis* Berl. on parasites and predators of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) Z. Ang. Ent., 94: 498-504.

NINI (1983) relataram como efeitos deletérios de B.t. sobre o parasitóide *Microplitis croceipes*, uma redução na porcentagem de emergência e uma diminuição do poder reprodutivo. Deve ser lembrado para esse tipo de interação que se um efeito danoso existe, só ocorre com doses altíssimas, condição não comum em tratamentos de campo. Além disso, a disseminação de bactérias por parte dos parasitóides é um tipo de interação positiva que também pode ocorrer, (BELL et alii, 1974).

Viroses e parasitóides podem competir dentro de um mesmo inseto hospedeiro, encurtando o período de desenvolvimento dos parasitóides (JAQUES & MORRIS, 1981). As toxinas produzidas por vírus como GV e NPV podem prejudicar os estágios embrionários e larval dos parasitóides (KAYA, 1970 ; KAYA & TANADA, 1973). Assim, parasitóides que se desenvolvem em hospedeiros infectados por viroses podem apresentar-se com tecidos melanizados ou serem encapsulados pelos hospedeiros. Por outro lado VERSOI & YENDOL (1982) mencionaram uma possível capacidade de discriminação pelos parasitóides entre larvas de *Lymantria dispar* infectadas e não infectadas por viroses.

ELLER et alii (1988) citaram que as interações adversas entre hospedeiros-parasitóides-patógenos podem ser de dois tipos: - diretamente deletérias quando patógenos infectam parasitóides, e - indiretamente deletérias quando patógenos alteram a fisiologia do hospedeiro de tal forma

que o parasitóide não pode completar seu desenvolvimento. As interações que acontecem entre *Microplitis croceipes* e o vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis zea*, segundo esses autores são indiretamente deletérias, pois não foram encontradas larvas do parasitóide infectadas ou encapsuladas que comprovassem a suscetibilidade do parasitóide ao vírus. Por outro lado, o período que o vírus leva para matar o hospedeiro é em torno de 5 dias o que não dá chances do parasitóide completar seu desenvolvimento.

LEVIN et alii (1981), da mesma forma, concluíram que a sobrevivência do parasitóide depende do tempo entre a oviposição pelo parasitóide na larva do hospedeiro e a ingestão do vírus pela larva.

HAMM et alii (1985), testando a compatibilidade de um Ascovirus isolado de *Spodoptera frugiperda*, com o parasitóide *Cotesia marginiventris*, relataram que o parasitóide pode facilmente transmitir o vírus entre as larvas do hospedeiro, apesar dos dados dos experimentos também demonstrarem efeitos deletérios sobre o desenvolvimento do parasitóide.

Por sua vez ALVES (1986b) citou que a ocorrência epizoótica de algumas viroses tem sido correlacionada positivamente com a presença de parasitóides, mostrando

que a ação conjunta dos dois inimigos naturais é importante no controle das pragas.

Durante o estudo da epizootia de *Nosema pyrausta* sobre *Ostrinia nubilalis*, SEGEL et alii (1986) observaram que o braconídeo *Macrocentrus grandis* foi afetado adversamente pela infecção direta do parasitóide, porém as fêmeas de *M. grandis* foram capazes de transmitir *N. pyrausta* para outras larvas de *O. nubilalis*. Por outro lado, HAMM et alii (1983) concluíram que o microsporídeo *Vairimorpha* sp. pode ser usado em conjunto com *Cotesia marginiventris* e *Microplitis croceipes* em programas de controle biológico, porque o microsporídeo parece não reduzir a eficiência dos parasitóides. Outras interações interessantes entre hospedeiros-parasitóides e protozoários também foram revisadas por BROOKS (1973).

Segundo JAKES & MORRIS (1981), nematóides e CPVs ainda não foram observados causando algum prejuízo a artrópodos benéficos. No entanto KAYA (1978) relatou que a interação do nematóide *Neoplectana carpocapsae* com *Apanteles militaris* sobre *Pseudaletia unipuncta* pode resultar em prejuízos indiretos ao parasitóide, devido a morte do hospedeiro antes que *A. militaris* possa completar seu desenvolvimento, ou ainda pelo contato das larvas e pupas diretamente com o patógeno antes da formação dos pupários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo.

3.1.1. Isolados do fungo Beauveria spp.

Todos os experimentos foram realizados com isolados que fazem parte do banco de patógenos do Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP, cuja origem, denominação, identificação, inseto hospedeiro e data de coleta constam da Tabela 2. Esses isolados encontram-se armazenados em sílica gel, água estéril, e em freezer sobre cadáveres de *Diatraea saccharalis* e fo-

Tabela 2. Relação dos isolados de *Beauveria* spp. com seus respectivos hospedeiros originais e procedências.

Denomi nação	Procedência	Identificação	Hospedeiro original	Data de coleta
196	Engenho Salgado, Usina Salgado, Ipojuca (PE)	<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	<i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i>	06-09-83
197	Usina Santa Lucia, Araras - SP	<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	<i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i>	06-10-83
210	IAA-PLANALSUCAR, Araras - SP	<i>Beauveria</i> <i>brongniartii</i>	<i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i>	08-11-83
258	IAA-PLANALSUCAR, Carpina - PE	<i>Beauveria</i> <i>brongniartii</i>	<i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i>	05-05-84
268	IAA-PLANALSUCAR Carpina - PE	<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	<i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i>	25-05-84
341	Usina Iracema Iracemaópolis - SP	<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	<i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i>	07-02-85
478	Cuiabá - MT	<i>Beauveria</i> <i>brongniartii</i>	<i>Solenopsis</i> <i>invicta</i>	22.09.86

ram purificados até a terceira repicagem para utilização nos experimentos.

Em todos os experimentos realizados, comparando-se esses sete isolados, a denominação dos tratamentos de 1 a 7 seguiu a ordem crescente da denominação recebida no banco de patógenos, ou seja 196=1, 197=2, 210=3, 258=4, 268=5, 341=6 e 478=7.

3.1.2. Meios de cultura para B. bassiana

A) Meio BDA mais antibiótico

Batata sem casca	200,00	g
Dextrose	15,00	g
Ágar	20,00	g
Sulfato de streptomina	0,25	g
Sulfato de deidroestreptomicina	0,25	g
Água destilada, q.s.p.	1000	ml

Esse meio foi utilizado para a purificação dos fungos e também nos testes de crescimento e esporulação.

B) Meio para determinação da atividade aminolítica (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

Ágar nutriente "Difco"	23	g
Amido solúvel de milho (Maizena) ^R	2	g
Água destilada, q.s.p.	1000	ml

C) Meio para determinação da atividade lipolítica dos isolados (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975)

"Tween-20"	10	ml
"Peptona Difco"	10	g
Cloreto de sódio	5	g
Cloreto de cálcio dihidratado...	0,1	g
Ágar granulado	20	g
Água destilada, q.s.p.	1000	ml

D) Meio para determinação da atividade proteolítica dos isolados (RAJAMANI & HILDA, 1987)

p/pH = 7

Leite em pó desnatado	10	g
Água destilada	100	ml
Ágar "Difco"	10	g
Água destilada	100	ml
NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (0,05 M)	300	ml

p/pH = 10

Leite em pó desnatado	10	g
Água destilada	100	ml
"Ágar Difco"	10	g
Água destilada	100	ml
NaHCO_3 , Na_2CO_3 (0,05 M)	300	ml

O leite em pó e o ágar foram diluídos separadamente, em 100 ml de água destilada e autoclavados, também

separadamente, assim como as soluções tampão, após o que foram misturados.

E) Meio para esporulação de *Beauveria bassiana*

(M.C.)

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	10,0 g
Água destilada, q.s.p.	1000 ml

F) Meio mínimo (Modificado de PONTECORVO et alii, 1953)

NaNO_3	6,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,52 g
KCL	0,52 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
KH_2PO_4	1,5 g
ZnSO_4	0,001g
glucose	10,0 g
Ágar Difco	15,0 g
Água q.s.p.	1000 ml

G) Meio SD + Y

Neopeptona	10,0 g
------------------	--------

Dextrose	40,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Água q.s.p.	1000 ml

H) Meio ÁGAR - ÁGUA

Ágar	20,0 g
Streptomicina	0,5 g
Água q.s.p.	1000 ml

3.1.3. Dietas utilizadas para D. saccharalis

A) Dieta à base de germe de trigo modificada de HENSLEY & HAMMOND (1968).

	Alimentação		Realimentação
Ácido ascórbico	5 g		2 g
Açúcar	135 g		135 g
Sais de Wesson	10 g		-
Nipagin	4,5g		5,5 g
Germe de trigo	80,0g		40,0 g
Farelo de soja	105,0g		195,0 g
Cloreto de colina	1,0g		1,0 g
Wintomylon ^R	0,5 ml		0,5ml
Vita gold ^R	1,0 ml		1,0ml
Solução vitamínica	30,0 ml		15,0ml
Formaldeído	2,0 ml		2,0ml
Ácido Acético	-		15 ml

	Alimentação		Realimentação	
Ágar	30,0	g	15	g
Água no liquidificador	1000	ml	1000	ml
Água na panela	1400	ml	1100	ml

B) Dieta à base de Levedura de cana-de-açúcar modificada de HENSLEY & HAMMOND (1968).

	Alimentação		Realimentação	
Ácido ascórbico	5	g	-	
Açúcar	14	g	14	g
Levedura	150	g	140	g
Nipagin	7	g	8	g
Farelo de soja	115	g	195	g
Ágar	24	g	30	g
Cloreto de colina	1	g	2	g
Pantomicina	3	ml	3	ml
Vita-gold ^R	1	ml	1	ml
Solução vitamínica	25	ml	15	ml
Formol	2	ml	4	ml
Ácido acético	-		25	ml
Água destilada liquidificador ...	1000	ml	1000	ml
Água destilada panela	1400	ml	1100	ml

3.1.4. Insetos utilizados

Foram utilizadas lagartas de 3º e 4º íns-
ta-

res de *Diatraea saccharalis* criadas em laboratório.

No bioensaio visando determinar o LT-50 dos isolados do fungo, foram utilizadas lagartas de 4^o ínstar. Nos dois primeiros ensaios de interação foram utilizadas lagartas de 3^o ínstar, nos outros oito foram utilizadas lagartas de 4^o ínstar. Em todos os bioensaios, excetuando-se as pertencentes à condição 1 (lagartas de *D. saccharalis* não inoculadas com *B. bassiana* e à condição 2 (lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com *B. bassiana*), as demais lagartas estavam parasitadas por *Cotesia flavipes*, *Metagonistylum minense* ou *Paratheresia claripalpis*, oriundas da criação do laboratório de Entomologia do Planalsucar, Araras-SP. Os insetos fornecidos para a 1.^a e 2.^a montagens do experimento I foram inoculados com apenas 1 larva dos parasitóides, como a eficiência do parasitismo estava sendo muito baixa, a partir da 3.^a montagem as lagartas de *D. saccharalis* foram inoculadas com duas larvas.

Os adultos do parasitóide *C. flavipes* foram obtidos da criação do Laboratório Entomológico da Usina Costa Pinto S.A. O nome genérico *Cotesia* foi adotado neste trabalho em substituição ao *Apanteles* devido ao trabalho de MASON (1981). Embora no Brasil não seja usual a utilização do nome *Cotesia flavipes*, nos EUA e países da Europa os pesquisadores têm utilizado esta denominação. (AUSTIN & DANGERFIELD, 1989).

Os adultos dos parasitóides *Metagonistylum minense* e *Paratheresia claripalpis* foram obtidos dos labo-

ratórios de Entomologia das estações experimentais da Coper-sucar em Jaú e Sertãozinho - SP.

3.2. Métodos

3.2.1. Bioensaios com D. saccharalis para obtenção do LT-50 dos diferentes isolados.

Para determinação do LT-50 dos sete isolados, estes foram produzidos em um meio de cultura especial para esporulação de *Beauveria bassiana* e aplicados na concentração de 10^7 conídios/ml de suspensão através de um micropulverizador do tipo "Air Brush". As 45 lagartas inoculadas foram mantidas individualizadas em placa de bioensaio, (Figura 1), dentro de BOD com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo alimentadas, a cada dois dias, com pedaços de colmo de milho. A mortalidade foi avaliada diariamente, confirmando-se o diagnóstico através dos sinais do patógeno (conidióforos e conídios).

Figura 1. Esquema das placas de bioensaio.

Com os resultados de mortalidade, calcularam-se os tempos letais 50 (LT-50) para cada isolado, utilizando-se um programa de PROBIT em computador CP-500 elaborado por HADDAD (1986), a partir do trabalho de Finney & Sokal (1958).

3.2.2. Determinação da capacidade de produção de enzimas dos isolados de B. bassiana e B. brongniartii.

Para estudar a capacidade de produção de en-

zimas dos diferentes isolados de *B.bassiana* e *B. brongniartii* foram utilizados meios de cultura sólidos, visando determinar as atividades: aminolítica, lipolítica e proteolítica. Com o auxílio de uma alça de platina cada isolado foi inoculado em três pontos nas placas contendo o meio de cultura apropriado para cada teste. Utilizaram-se três placas por isolado e por teste, perfazendo assim nove repetições por tratamento. Antes da realização dos ensaios de atividade enzimica, os isolados cresceram em meio mínimo.

Na elaboração dos meios de cultura para testar as atividades aminolíticas e lipolíticas, empregaram-se as técnicas descritas por HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975). No entanto, para o teste de atividade proteolítica seguiu-se a técnica de RAJAMANI & HILDA (1987).

Após a inoculação as placas foram levadas para a estufa de incubação (BOD) regulada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 16 horas, onde as colônias se desenvolveram produzindo halos correspondentes, os quais refletiam a atividade enzimica de cada isolado.

A medição do diâmetro médio do halo e da colônia foi realizada após sete dias para as enzimas amilase e lipase e após cinco dias para protease. A atividade enzimica expressou-se pela área do halo produzido pela enzima. Para isto, utilizou-se a seguinte fórmula, apresentada por

LECUONA (1986):

$$AE = \tilde{n} \cdot \left[\left(\frac{D}{2} \right)^2 - \left(\frac{d}{2} \right)^2 \right]$$

onde,

AE = área enzimica

$\tilde{n} = 3,1416$

D = diâmetro médio maior (inclui a colônia central do fungo e halo enzimico)

d = diâmetro médio menor (somente da colônia do fungo)

A atividade aminolítica foi verificada revelando-se o halo mediante a colocação de lugol nas placas. As colônias que apresentavam esta atividade enzimica eram circundadas por um halo amarelo em contraste com a coloração azul do meio de cultura, devido à reação do lugol com o amido do meio.

A atividade proteolítica foi verificada colocando-se ácido tricloroacético (TCA) a 10% sobre a superfície do meio. Após 10 minutos, o excesso de TCA foi drenado e o halo pôde ser medido devido ao aumento do contraste da coloração do meio com relação ao halo, pois o TCA precipita as proteínas do meio, tornando-o mais opaco (RAJAMANI & HILDA, 1987).

A atividade lipolítica foi verificada direta-

mente e ainda através da precipitação de cristais de laurato de cálcio a partir do monolaurato de Sorbitan (Tween 20) que reage com o cálcio do meio.

Os resultados dos testes efetuados para as três enzimas foram analisados segundo um programa de computador, que utiliza o teste t para comparação das médias.

3.2.3. Crescimento dos fungos e produção de conídios em meio BDA, nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Com a finalidade de determinar o crescimento dos fungos e a produção de conídios nas diferentes temperaturas, procedeu-se à inoculação em três pontos das placas de Petri, contendo meio de cultura BDA mais antibiótico.

Utilizaram-se três placas por isolado para cada temperatura testada, das quais foram selecionadas seis colônias, retirando-se duas de cada placa.

Após seis dias de incubação, o diâmetro médio das seis colônias selecionadas foi avaliado. Em seguida, com o auxílio de um bisturi, essas colônias foram retiradas das placas e colocadas em água estéril mais espalhante adesivo, sendo os seus conídios removidos com a ajuda de um pincel.

A suspensão de conídios obtida foi quantificada com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, esquema fatorial. Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância e teste de Tukey, nos casos onde houve significância.

3.2.4. Determinação das dimensões dos conídios

Com a finalidade de comparar morfológicamente os isolados de *Beauveria*, foram preparadas lâminas permanentes montadas em glicerina com os conídios dos diferentes isolados, sendo mensurados com o auxílio de uma ocular micrométrica, no aumento de 1000 vezes, sob objetiva de imersão, o comprimento e a largura de cada isolado os quais foram obtidos de colônias desenvolvidas em meio BDA.

3.2.5. Determinação dos zimogramas de alfa-esterases

Os isolados purificados foram inoculados em meio SD + y líquido e incubados a 25°C sob agitação (150 rpm) durante 7 dias, para obtenção de micélio. A massa micelial foi recolhida através de lavagens e centrifugações, sendo o micélio obtido, seco em papel de filtro e pesado. Para ob-

tenção das proteínas intracelulares, o micélio foi tritura - do com nitrogênio líquido, adicionando-se o material obtido ao tampão tris H-Cl 0,04M, pH= 6,8 (aproximadamente 3g de micélio para 1 ml de tampão). Esta suspensão foi centrifugada a 16.000 rpm durante 40 min a 4°C. O sobrenadante, contendo o extrato de proteínas, foi então repartido em ampolas de plástico, que foram congeladas a -80°C.

Para a análise eletroforética de isoenzimas, utilizou-se um gel de poliacrilamida a 7,5%, com sistema descontínuo de tampão (HAMES, 1981). Para a coloração das alfa-esterases, foi utilizado alfa naftil acetato, fast blue RR, utilizando-se como tampão tris HCl, 0,5M, pH=7,1.

3.2.6. Preparo das suspensões de conídios utilizados nos bioensaios.

Para o preparo das suspensões foram coletados conídios produzidos em meio especial para esporulação de *Beauveria*. Estes foram suspensos em 10 ml de água estéril contendo espalhante adesivo AGRAL, na base de 1 gota/litro de água. A suspensão obtida foi colocada no agitador por um período suficiente para a sua homogeneização.

Em seguida, a padronização foi feita através da contagem dos conídios em uma câmara de Neubauer para a obtenção da concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/ml.

3.2.7. Experimento I. Bioensaios para avaliação da interação entre fungo-parasitóides-praga.

Após a seleção do isolado 196 de *B.bassiana*, iniciou-se a parte principal da pesquisa que constou de uma série de bioensaios de acordo com o seguinte delineamento experimental: blocos casualizados, esquema fatorial com oito condições da praga e três fases de aplicação do fungo, totalizando 24 tratamentos.

Cada tratamento constou de 30 lagartas de *D. saccharalis* perfazendo um total de 720 insetos por bioensaio. Os mesmos 24 tratamentos foram repetidos em cada uma das 3 temperaturas estudadas: 22, 26 e 30°C. O delineamento experimental precisou ser dividido em blocos devido ao grande número de tratamentos, que impediu que se trabalhasse com um maior número de repetições por tratamento numa só vez, sendo necessário repetir-se o mesmo bioensaio por várias vezes. Cada montagem do experimento, portanto, foi considerada um bloco. Na temperatura de 26°C foi realizado um maior número de montagens do experimento devido as mudanças ocorridas na metodologia citada no item 3.1.4. Os 10 bioensaios realizados foram denominados Experimento I.

As fases de aplicação do fungo referem-se à idade do parasitóide dentro da lagarta de *D.saccharalis*, tendo sido utilizados parasitóides com um, três e seis dias

de idade larval. Dessa forma, as oito condições que serão descritas a seguir, se repetem dentro de cada fase do parasitóide (um, dois e três), perfazendo os 24 tratamentos.

CONDIÇÃO 1 - Lagartas de *D.saccharalis* que não foram inoculadas, e que ao chegarem ao Laboratório de Patologia foram transferidas para dieta natural (pedaços de colmo de milho), a qual também foi fornecida para as outras condições.

CONDIÇÃO 2 - Lagartas de *D.saccharalis* inoculadas com o fungo.

CONDIÇÃO 3 - Lagartas de *D. saccharalis* submetidas à oviposição de *C. flavipes*.

CONDIÇÃO 4 - Lagartas de *D. saccharalis* submetidas à oviposição de *C.flavipes* e também inoculadas com o fungo.

CONDIÇÃO 5 - Lagartas de *D. saccharalis* submetidas à larviposição de *M.minense*.

CONDIÇÃO 6 - Lagartas de *D.saccharalis* submetidas à larviposição de *M.minense* e também inoculadas com o fungo.

CONDIÇÃO 7 - Lagartas de *D.saccharalis* subme-

tidas à larviposição de *P. claripalpis*.

CONDIÇÃO 8 - Lagartas de *D. saccharalis* submetidas à larviposição de *P. claripalpis* e também inoculadas com o fungo.

Todos estes insetos, ou seja, as 720 lagartas inoculadas ou não com os parasitóides foram fornecidas mensalmente pelo Laboratório de Entomologia do Planalsucar. As inoculações foram feitas seguindo a metodologia descrita por MACEDO et alii (1983) que correspondeu, resumidamente, ao que se segue:

A. Inoculação dos ovos de *C. flavipes*

A inoculação de *Cotesia flavipes* foi feita aproximando-se uma lagarta de *D. saccharalis* a uma caixa de plástico contendo adultos do parasitóide. Essa caixa possui um pequeno orifício em sua tampa, o que possibilitou que apenas um indivíduo adulto saísse por ele. As fêmeas foram geralmente as primeiras a tomarem essa iniciativa e, encontrando o seu hospedeiro faziam a postura rapidamente.

B. Inoculação das larvas de *M. minense* e *P. claripalpis*.

A inoculação das larvas desses dois dípteros nas lagartas de *D. saccharalis* foi feita com o auxílio

microscópio estereoscópico, sob o qual foi colocado um pequeno vidro de relógio contendo soro fisiológico. Dentro desses recipientes foram colocados os abdômes das moscas grávidas, que foram abertos com o auxílio de um estilete para liberação das larvas a serem inoculadas. Depois dessa operação, as larvinhas dos parasitóides foram coletadas uma a uma com o auxílio de um pincel muito fino e colocadas sobre o dorso das lagartas de *D. saccharalis*. Essas larvinhas imediatamente penetraram na epiderme da lagarta, completando-se a inoculação.

Após serem inoculadas nesse laboratório, as lagartas de *D. saccharalis* foram individualizadas dentro de pequenas caixas plásticas e realimentadas com a dieta modificada de Hensley & Hammond (1968) e mantidas no laboratório por mais seis dias, período em que outras lagartas foram também inoculadas, para que se tivesse no sexto dia três lotes de lagartas contendo parasitóides com um, três e seis dias de desenvolvimento larval (720 lagartas ao todo).

No laboratório de Patologia, essas lagartas foram imediatamente separadas, sendo que os tratamentos que não receberam o fungo foram transferidos para as placas de bioensaio já citadas e realimentadas com dieta natural. Os tratamentos inoculados com o fungo, foram colocados em placas de Petri de dimensões 1,40 x 2,0 cm onde foram pulverizados com 1 ml da suspensão de conídios do fungo e, posteriormente, transferidos para as placas de bioensaio e reali-

mentadas com dieta natural. A finalidade de se utilizar colmo de milho ao invés da dieta de Hensley & Hammond, foi evitar que o fungo fosse inativado pela presença de grande quantidade de anticontaminantes da dieta artificial.

Os insetos inoculados através dessa metodologia nos seis primeiros bioensaios realizados foram, posteriormente, colocados à temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, a sétima e oitava montagens foram mantidas a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e a nona e décima montagens a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo efetuadas observações diárias até a emergência dos adultos dos parasitóides, observando-se o número de lagartas mortas pelo fungo, como também dados relativos ao período de desenvolvimento de todos os insetos, efeito do fungo sobre os parasitóides, e o número de casos onde ocorreram ambos os agentes.

3.2.8. Bioensaios com pupas dos parasitóides da broca da cana-de-açúcar.

Os dois experimentos, relacionados, a seguir foram realizados para se determinar a possível patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 196, sobre pupas dos parasitóides da broca da cana-de-açúcar.

3.2.8.1. Experimento II. Inoculação de
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.
em pupas de Cotesia flavipes (Cam.)

Cinco massas de casulos de *Cotesia flavipes* contendo aproximadamente 70 pupários do parasitóide cada uma, foram pulverizadas com suspensão do fungo, contendo cerca de 10^7 conídios/ml, empregando-se um micropulverizador do tipo "Air Brush". As massas, após esse tratamento, foram transferidas para placas de cristalização de 10 cm de diâmetro por 5 cm de altura e, posteriormente, mantidas em câmaras do tipo BOD sob as temperaturas de 22, 26 e 30°C, até a emergência dos micro-himenópteros adultos.

Foram utilizadas seis placas de cristalização, sendo que duas placas foram mantidas em cada temperatura, uma contendo pupários tratados com a suspensão de conídios e outra com pupários tratados apenas com água, representando o tratamento testemunha, constando o experimento, portanto, de seis tratamentos:

- T₁ Temperatura 22°C pupários tratados com suspensão de conídios
- T₂ Temperatura 22°C pupários tratados com água estéril
- T₃ Temperatura 26°C pupários tratados com suspensão de conídios
- T₄ Temperatura 26°C pupários tratados com água estéril
- T₅ Temperatura 30°C pupários tratados com suspensão de conídios
- T₆ Temperatura 30°C pupários tratados com água estéril

Após a emergência e morte dos adultos estes foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 2%, lavados com água destilada estéril e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água, para se verificar o possível desenvolvimento do patógeno.

3.2.8.2. Experimento III. Inoculação de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. em pupas de Metagonistylum minense (Townsend.) e Paratheresia claripalpis (Wulp.)

A suscetibilidade das pupas de ambas as espécies de dípteros foi estudada utilizando-se 50 pupas de cada espécie, para cada um dos tratamentos, relacionados a seguir:

- T₁ Temperatura 22°C, 50 pupários tratados com água estéril
- T₂ Temperatura 22°C, 50 pupários tratados com a suspensão de conídios
- T₃ Temperatura 26°C, 50 pupários tratados com água estéril
- T₄ Temperatura 26°C, 50 pupários tratados com a suspensão de conídios
- T₅ Temperatura 30°C, 50 pupários tratados com água estéril
- T₆ Temperatura 30°C, 50 pupários tratados com a suspensão de conídios.

Após serem pulverizados com a suspensão de conídios os insetos foram acondicionados em copos plásticos contendo um pedaço de algodão no fundo, recobertos com papel filtro e molhados com água destilada estéril para manutenção da umidade. Após a emergência dos adultos e, à medida em que eles iam morrendo, os mesmos eram desinfestados como no experimento anterior e colocados em placas de Petri com ágar-água para se verificar o possível desenvolvimento do fungo. Foram comparadas também nesse experimento, as porcentagens de emergência de adultos dos tratamentos em relação às testemunhas.

3.2.8.3. Experimento IV - Inoculação de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. em adultos de Cotesia flavipes (Cam.).

Para se testar a patogenicidade do fungo Beauveria bassiana ao braconídeo C. flavipes adotou-se a seguinte metodologia:

Placas de cristalização iguais às utilizadas no item 3.2.8.1. foram pulverizadas com o auxílio de um micro-pulverizador do tipo "Air Brush", com uma suspensão de conídios do fungo, contendo cerca de 10^7 conídios/ml. Após a secagem da suspensão aplicada, uma caixa plástica de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura contendo 5 massas de casulos com mais ou menos 70 parasitóides recém-emergidos/massa,

foi introduzida dentro desse recipiente que foi fechado com filme plástico tipo Magipac^R. Assim, os parasitóides ao saírem da caixa plástica andavam pelas paredes da placa de cristalização, entravam em contato com os conídios do fungo, e dessa maneira se contaminavam.

Foram utilizadas seis dessas placas contendo aproximadamente 300 *C.flavipes* cada uma. Duas placas foram mantidas em cada uma das três temperaturas estudadas, sendo que, para cada temperatura preparou-se uma placa de cristalização tratada com conídios do fungo e outra apenas com água, correspondendo ao tratamento testemunha, constando o experimento, portanto, dos seis tratamentos relacionados a seguir:

- T₁ Temperatura 22°C insetos inoculados por caminhamento sobre *B. bassiana*.
- T₂ Temperatura 22°C insetos inoculados com água estéril
- T₃ Temperatura 26°C insetos inoculados por caminhamento sobre *B. bassiana*.
- T₄ Temperatura 26°C insetos inoculados com água estéril
- T₅ Temperatura 30°C insetos inoculados por caminhamento sobre *B. bassiana*.
- T₆ Temperatura 30°C insetos inoculados com água estéril

Após cerca de 24 horas, aproximadamente, foram retirados todos os insetos que se encontravam mortos dentro das placas

mantidas a 30°C. Esses insetos foram lavados com hipoclorito de sódio a 2%, enxaguados com água destilada estéril e colocados em placa de Petri contendo meio de cultura ágar-água para se verificar o possível desenvolvimento do patógeno. O mesmo foi realizado após 36 horas com os insetos mantidos a 26°C e após 48 horas com os insetos mantidos a 22°C.

3.2.8.4. Experimento V. Inoculação de conídios de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. diretamente sobre adultos de Cotesia flavipes (Cam.) recém-mortos.

Para verificar se a colonização dos adultos de C.flavipes pelo fungo B.bassiana possa ter sido realmente a causa da morte desses parasitóides ou se a colonização possa ter ocorrido após a morte dos insetos, realizaram-se os experimentos de números V e VI, utilizando-se a mesma quantidade de massas do experimento IV. Imediatamente após a morte dos adultos, os mesmos foram colocados em placas de cristalização e pulverizados com uma suspensão de conídios de B.bassiana contendo cerca de 10^7 esporos/ml. Após 24 horas esses insetos foram coletados e desinfestados conforme procedimento descrito no item 3.2.8.3., e colocados em placa de Petri contendo meio de cultura ágar-água, para se verificar o possível desenvolvimento de patógeno.

3.2.8.5. Experimento VI. Contato de adultos recém mortos de Cotesia flavipes (Cam.) com a superfície de um recipiente contaminado por Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.

Esse experimento difere do anterior apenas pelo fato da suspensão de conídios de *B.bassiana* ter sido aplicada às paredes das placas de cristalização antes da transferência dos insetos mortos.

3.2.8.6. Experimento VII. Inoculação de *Beauveria bassiana* em adultos de Metagonistylum minense e Paratheresia claripalpis

A suscetibilidade dos adultos das duas espécies foi testada liberando-se cerca de 50 moscas de cada espécie, dentro de gaiolas teladas de 13cm de diâmetro por 16cm de altura nas quais uma tira de papel filtro de 36 x 16cm, que foi pulverizada com a suspensão de conídios contendo cerca de 10^7 conídios/ml, foi colocada paralela às suas paredes.

Foram utilizadas 12 gaiolas teladas, sendo que nas gaiolas I, II e III foram colocados 50 adultos de *Metagonistylum minense* em cada uma, e mantidas às temperaturas de 22, 26 e 30°C, respectivamente. As gaiolas IV, V e VI, correspondiam aos tratamentos, onde o papel filtro foi banhado apenas com água esterilizada.

Da mesma forma, nas gaiolas VII, VIII e IX foram colocados cerca de 50 adultos de *Paratheresia claripalpis* em cada uma e mantidas às temperaturas de 22, 26 e 30°C, respectivamente, sendo que as gaiolas X, XI e XII representaram as testemunhas desse grupo.

Essas gaiolas, contendo os insetos foram revisadas diariamente, anotando-se o número de insetos mortos. Estes eram retirados, desinfestados com solução de hipoclorito, lavados com água destilada estéril e colocados em placa de Petri contendo meio de cultura ágar-água, para se verificar o possível desenvolvimento do patógeno.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bioensaios com D.saccharalis para obtenção do LT-50 dos diferentes isolados

Os resultados obtidos no bioensaio realizado para determinação dos LT-50 dos sete isolados dos fungos *Beauveria bassiana* e *B.brongniartii* testados para o controle de *Diatraea saccharalis* encontram-se representados nas Tabelas 3 e 4 e também na Figura 2.

Verifica-se que os patógenos proporcionaram uma mortalidade superior à 80% após o 16 dia da inoculação, com exceção dos isolados 197 e 258 que foram menos patogênicos (Tabela 3).

Verifica-se que o isolado 478 (tratamento 7) foi o que proporcionou o menor LT-50, sendo portanto, o isolado mais patogênico à *Diatraea saccharalis*, seguido em ordem crescente pelo isolado 341 (tratamento 6), 196 (tratamento 1), 268 (tratamento 5), 210 (tratamento 3), 258 (tratamento 4) e, finalmente, 197 (tratamento 2) que se mostrou menos virulento. Porém essas diferenças não foram sig-

nificativas estatisticamente como demonstrado pelo teste do x^2 . (Tabela 4)

Verifica-se também que as maiores porcentagens totais de mortalidade, obtidas com os isolados 478 e 341 corresponderam aos menores LT-50, de maneira inversa, os isolados 258 e 197 que proporcionaram porcentagens de mortalidade totais inferiores corresponderam aos maiores LT-50. Os isolados 196, 210 e 268 comportaram-se de maneira mediana em relação aos demais, sendo que o 196 foi o que esteve mais próximo do primeiro grupo em relação ao LT-50. (Figura 2).

Tabela 3. Porcentagens das mortalidades acumuladas de lagartas de 4º ínstar de *D. saccharalis* devidas aos diferentes isolados de *B. bassiana* e *B. brongniartii*, na dosagem de 10^7 conídios/ml.

Dias após inocula ção	I S O L A D O S						
	196	197	210	258	268	341	478
	Mortalidade acumulada (%)						
3	0	0	0	11,1	0	0	0
4	17,8	11,1	6,7	20,0	11,1	17,8	24,4
5	37,8	26,7	28,9	31,1	44,4	46,7	40,0
6	57,8	35,6	48,9	48,9	53,3	57,8	66,7
7	66,7	37,8	62,2	55,6	64,4	73,3	73,3
8	73,3	46,7	68,9	57,8	64,4	80,0	82,2
9	77,8	55,6	71,1	60,0	71,1	86,7	84,4
10	77,8	66,7	77,8	64,4	71,1	86,7	88,9
11	80,0	66,7	77,8	64,4	73,3	88,9	88,9
12	80,0	71,1	84,4	64,4	77,8	88,9	91,1
13	82,2	73,3	84,4	66,7	80,0	88,9	91,1
14	84,4	73,3	84,4	68,9	80,0	88,9	91,1
15	84,4	73,3	86,7	68,9	80,0	88,9	91,1
16	84,4	73,3	86,7	68,9	82,2	88,9	93,3

Tabela 4. TL-50, intervalos de confiança (IC) e modelo matemático obtidos com a aplicação de sete isolados de *B.bassiana* e *B.brugniartii* para o controle de lagartas de 4º ínstar de *D.saccharalis*, na dosagem de 10^7 conídios/ml.

Isola dos	Tratamentos	TL-50 (dias)	IC (Dias)	Modelo Matemático $y = a + b (\log x)^1$	Nº ciclos convergência	Valor do χ^2
196	1	5,8884	5,1380 a 6,7484	$2,74990 + 2,92222 \cdot \log x$	02	4,80 ns
197	2	8,4101	7,9028 a 8,9499	$2,23210 + 2,99297 \cdot \log x$	02	2,07 ns
210	3	6,7464	6,1083 a 7,4511	$1,91876 + 3,71649 \cdot \log x$	02	6,27 ns
258	4	7,7712	6,9958 a 8,6325	$3,02876 + 2,21366 \cdot \log x$	02	4,91 ns
268	5	6,3623	5,5250 a 7,3266	$2,81277 + 2,72174 \cdot \log x$	02	7,09 ns
341	6	5,3562	4,5735 a 6,2729	$2,51155 + 3,41417 \cdot \log x$	02	4,99 ns
478	7	5,2142	4,6111 a 5,8961	$2,39919 + 3,62641 \cdot \log x$	02	3,03 ns

ns: Não significativo, isto é, os valores de χ^2 calculados são menores que os da Tabela.

(1) onde x = tempo em dias e y = probit

Figura 2. Porcentagens de mortalidade total x tempo letal médio (LT-50) obtidos para os isolados do fungo *Beauveria* spp. testados contra *D. saccharalis*.

4.2. Determinação da capacidade de produção de enzimas dos isolados de B. bassiana e B. brongniartii

Pelos resultados obtidos em meio especial para produção de amilase para os sete isolados testados verifica-se que o isolado que apresentou maior atividade enzimica foi o de número 197 (tratamento 2), seguido pelo 341 (tratamento 6), 258 (tratamento 4), 196 (tratamento 1); esses dois últimos não diferindo estatisticamente, 210 (tratamento 3), 268 (tratamento 5) e, finalmente, 478 (tratamento 7) (Tabela 5).

Observa-se também, através desses resultados, que o isolado 478 que apresentou o menor LT-50, foi o isolado com menor atividade enzimica, para amilase, e que o isolado 196, apresentou novamente um comportamento mediano.

Com relação à produção de lipase, (tabela 6) verifica-se que apenas o isolado 478 pertencente a espécie B. brongniartii apresentou atividade enzimica. No entanto, apesar da formação do halo de descoloração em torno de todas as colônias cultivadas, apenas em quatro delas apareceram os cristais de laurato de cálcio.

Tabela 5. Valores médios de diâmetro das colônias (cm), diâmetro do halo (cm) e área enzimica (AE, cm²) de sete isolados de *B.bassiana* e *B.brongniartii* cultivados em meio especial para produção de amilase, após sete dias de desenvolvimento na temperatura de 26°C.

Isolados	Tratamentos	∅ colônia (cm)	∅ halo (cm)	AE (cm ²)
196	1	3,70	4,10	2,453030 c
197	2	3,76	4,26	3,150300a
210	3	3,65	4,01	2,164710 d
258	4	3,56	4,33	2,603580 bc
268	5	3,06	3,42	1,867930 e
341	6	3,55	4,00	2,696690 b
478	7	3,07	3,27	1,079270 f

Teste F= 73,35**

CV% = 11,566500

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6. Valores médios de diâmetro da colônia (cm), e diâmetro do halo (cm) de sete isolados de *B. bassiana* e *B. brongniartii*, cultivados em meio especial para produção de lipase, após sete dias de desenvolvimento na temperatura de 26°C.

Isolados	Tratamentos	∅ colônia	∅ halo
196	1	2,94	-
197	2	2,83	-
210	3	2,93	-
258	4	2,72	-
268	5	2,74	-
341	6	2,66	-
478	7	2,68	4,89

Pela atividade proteolítica dos isolados (tabelas 7 e 8) verifica-se a influência do pH do meio na atividade enzimica dos isolados, pois o mesmo meio de cultura, ajustado a diferentes valores de pH, proporcionou respostas diferentes dos isolados. No pH 7 (Tabela 7) o isolado mais produtivo foi o 258 que diferiu de todos os outros isolados. Os isolados 197 e 210 não diferiram entre si, demonstrando atividades muito semelhantes, porém eles também não diferiram do 478 que, por sua vez, não diferiu do 196, novamente aparecendo entre os resultados medianos. Os isolados 268 e 341 não diferiram entre si, sendo os menos produtivos.

A atividade enzimica dos sete isolados em meio especial para produção de protease, ajustando para pH 10 (Tabela 8), apresentou-se bastante superior com relação ao pH mais baixo, sendo que nesse pH todos os isolados apresentaram atividades enzimicas semelhantes.

A relação entre produção de lipase e virulência foi observada, para isolados de *B.brongniartii* por PARIS & SEGRETAIN (1978) e PARIS & FERRON (1979). Dessa forma a maior virulência do isolado 478 poderia ser relacionada com essa característica. Por outro lado, os isolados 341 e 196 de *B.bassiana* que estiveram entre os mais virulentos não apresentaram atividade lipolítica. Assim estes resultados coincidiram com os de CHAMPLIN et alii (1981) e PEKRUL &

Tabela 7. Valores médios de diâmetro das colônias (cm), diâmetro do halo (cm) e área enzimica (AE, cm²) de sete isolados de *B. bassiana* e *B. brongniartii* cultivados em meio especial para produção de protease, pH=7, após cinco dias de desenvolvimento na temperatura de 26°C.

Isolados	Tratamentos	Ø colônia (cm)	Ø halo (cm)	AE (cm ²)	
196	1	1,56	1,71	0,385511	c
197	2	1,54	1,72	0,443533	b
210	3	1,51	1,68	0,433922	b
258	4	1,71	1,91	0,568989	a
268	5	1,31	1,47	0,350156	d
341	6	1,37	1,53	0,342278	d
478	7	1,65	1,81	0,424156	b,c

Teste F = 14,29**

CV% = 14,404500

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8. Valores médios de diâmetro das colônias (cm), diâmetro do halo (cm) e área enzimica (AE, cm²) de sete isolados de *B.bassiana* e *B.brongniartii* cultivados em meio especial para produção de protease, pH 10, após cinco dias de desenvolvimento na temperatura de 26 °C.

Isolados	Tratamentos	Ø colônia (cm)	Ø halo (cm)	AE (cm)
196	1	1,09	1,48	0,783656 a
197	2	1,10	1,47	0,730622 a
210	3	1,22	1,58	0,787567 a
258	4	1,16	1,48	0,699100 a
268	5	1,04	1,34	0,777989 a
341	6	1,10	1,48	0,788400 a
478	7	1,10	1,09	0,787900 a

Teste F = 0,62NS.

CV% = 17,690700

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

GRULA (1979) que encontraram uma correlação negativa entre produção de enzimas e virulência para *B.bassiana*. Além disso, métodos diferentes utilizados para detectar a atividade enzimica também podem conduzir a conclusões diferentes como ficou demonstrado pela utilização dos meios de RAJAMANI & HILDA (1987). As diferenças entre metodologias utilizadas também devem ser responsáveis pelo fato da autora PACCOLA-MEIRELES (1988) ter obtido produção de lipase para todos os isolados testados por ela, inclusive o 196, utilizado na presente pesquisa.

Analisando a Figura 3, verifica-se que os isolados 197, 258, 196 e 341 foram os que apresentaram maiores atividades amilolíticas e proteolíticas ao mesmo tempo. No entanto comparando-se a atividade enzimica com a virulência, observa-se que não existe uma correlação entre esses dois fatores.

Figura 3. Tempo letal médio (LT-50) x atividade enzimática para protease, (pH = 7) e amilase dos sete isolados do fungo *Beauveria* spp. testados contra *D. saccharalis*.

4.3. Crescimento dos fungos e produção de conídios em meio BDA, nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Os resultados obtidos, foram expressos pela média do número de conídios produzidos pelas colônias de cada isolado, quando submetido às diferentes temperaturas e fotoperíodo de 16 horas, (Tabela 9). As médias dos diâmetros das mesmas colônias foram registrados na (Tabela 10). Foram anotados os resultados dos testes de Tukey aplicados para as interações entre temperaturas e produção de conídios e temperaturas e diâmetros das colônias, respectivamente, para os diferentes isolados (Tabela 11 e 12).

Verificou-se, através da análise de variância, efeito significativo dos fatores: temperatura e isolados (tratamentos), como também da interação entre esses fatores em ambos os casos.

Para produção de conídios (Tabelas 9 e 11), através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, verificou-se que pode-se formar dois grupos entre os isolados com relação a maior e menor produção. O grupo 1, representado pelos mais produtivos, formado pelos isolados 196, 210 e 268 que não diferem entre si estatisticamente, mas diferem dos dois outros isolados. O grupo 2 representado pelos menos produtivos reúne os isolados 197, 258, 341 e 478. Comparando-se as temperaturas verifica-se também que se formam 2 grupos:

grupo 1 representado pelas temperaturas 26 e 30°C que proporcionaram maior produtividade e não diferiram entre si, e grupo 2 representado pela temperatura de 22°C.

Para as medidas dos diâmetros das colônias (Tabelas 10 e 12), através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, verifica-se que também podemos formar dois grupos distintos entre os isolados.

Neste caso, o grupo 1 seria formado pelos isolados 196, 210, 341 e 478 que apresentaram um maior diâmetro de colônia, praticamente não diferindo estatisticamente entre si, mas diferindo dos isolados 268, 197, 258 que apresentaram diâmetros de colônia menores.

As temperaturas interagindo com os isolados também formaram dois grupos distintos, sendo eles representados por 26 e 30°C (grupo 1), que proporcionaram maior crescimento e por 22°C (grupo 2) que proporcionou menor crescimento das colônias do fungo.

As temperaturas de 26 e 30°C, portanto, demonstraram ser mais apropriadas para o crescimento e conidição de *Beauveria* spp. Os isolados 196 e 210, por sua vez, foram os que se mostraram mais adequados para o cultivo em meio artificial, característica importante para utilização em programas de controle integrado de pragas.

Tabela 9. Produção de conídios por colônia ($\times 10^7$) de isolados de *B. bassiana*, após seis dias de desenvolvimento em meio BDA, nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Isola- dos	Trata- mentos	R E P E T I Ç Õ E S					
		1	2	3	4	5	6
Temperatura 22°C							
196	1	2,8	2,6	2,5	2,5	2,4	2,6
197	2	4,2	4,4	1,8	2,9	3,2	3,0
210	3	1,3	1,1	1,4	1,9	2,5	1,7
258	4	1,4	2,6	3,7	4,4	1,2	2,2
268	5	3,3	3,0	3,0	3,3	2,0	2,9
341	6	2,4	2,0	2,0	2,6	1,9	2,2
478	7	2,0	2,8	1,8	1,8	1,9	2,4
Temperatura 26°C							
196	1	24,0	24,0	19,0	17,0	14,0	15,0
197	2	15,0	4,6	21,0	14,0	3,6	6,0
210	3	23,0	12,0	12,0	18,0	17,0	13,0
258	4	7,5	4,4	10,0	8,4	4,5	5,7
268	5	20,0	30,0	15,0	17,0	26,0	16,0
341	6	6,7	7,6	4,9	6,6	9,8	6,3
478	7	16,0	16,0	16,0	21,0	13,0	14,0
Temperatura 30°C							
196	1	21,0	30,0	20,0	31,0	21,0	16,0
197	2	9,6	10,0	7,5	13,0	6,0	13,0
210	3	26,0	22,0	18,0	29,0	22,0	24,0
258	4	4,8	6,0	4,2	4,8	4,7	3,8
268	5	13,0	12,0	14,0	15,0	16,0	13,0
341	6	8,9	7,5	6,5	6,9	7,8	5,5
478	7	4,8	5,0	5,0	2,7	2,7	2,8

Tabela 10. Diâmetro médio das colônias (cm) de sete isolados de *B. bassiana* após seis dias de desenvolvimento, em meio BDA, nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Isola- dos	Trata- mentos	R E P E T I Ç Õ E S					
		1	2	3	4	5	6
Temperatura 22°C							
196	1	2,25	2,35	2,30	2,40	2,30	2,35
197	2	1,40	1,45	1,25	1,35	1,35	1,40
210	3	2,00	2,25	2,10	2,00	2,50	2,15
258	4	1,20	1,10	1,40	1,30	1,10	1,25
268	5	2,00	1,90	1,90	1,85	1,90	1,95
341	6	2,25	2,10	2,20	2,40	1,75	2,20
478	7	2,05	2,00	2,00	2,25	2,40	2,10
Temperatura 26°C							
196	1	2,60	2,35	2,40	2,70	2,40	2,50
197	2	1,50	1,50	1,50	1,30	1,60	1,50
210	3	2,55	1,90	2,00	2,30	2,70	2,80
258	4	1,50	1,30	1,30	1,70	1,70	1,55
268	5	1,85	2,00	2,30	1,90	2,15	2,25
341	6	2,15	2,40	2,15	2,25	2,40	2,00
478	7	2,45	2,20	2,40	2,20	2,40	2,10
Temperatura 30°C							
196	1	2,40	2,50	2,55	2,40	2,50	2,40
197	2	1,60	1,50	1,55	1,60	1,65	1,80
210	3	2,40	2,40	2,40	2,50	2,45	2,40
258	4	1,55	1,40	1,75	1,85	1,60	1,70
268	5	1,55	1,55	1,55	1,60	1,50	1,55
341	6	2,25	2,40	2,30	2,30	2,40	2,30
478	7	2,00	1,80	1,90	1,90	1,90	1,95

Tabela 11. Resultados da análise estatística para os valores médios da produção de conídios das colônias dos sete isolados testados nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Isolados	Tratamentos	Temperaturas			Média geral para isolados
		22°C (1)	26°C (2)	30°C (3)	
196	1	2,5667 c	18,8333 b	23,1667 a	14,85560 A
197	2	3,2500 b	10,7000 a	9,8500 a	7,93333 B
210	3	1,6500 c	15,8333 b	23,5000 a	13,66110 A
258	4	2,5833 a	6,7500 a	4,7167 a	4,68333 C
268	5	2,9167 c	20,6667 a	13,8333 b	12,47220 A
341	6	2,1833 b	6,9833 a	7,1853 a	5,45000 BC
478	7	2,1167 b	16,0000 a	3,8333 b	7,31667 BC
Média geral p/ temperaturas		2,46667 B	13,68100A	12,29760A	

I S O L A D O S							
Temperaturas	196 (1)	197 (2)	210 (3)	258 (4)	268 (5)	341 (6)	478 (7)
22°C(1)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
26°C(2)	18,8333 a	10,7000 bc	15,8333 ab	6,7500 c	20,6667 a	6,9833 c	16,000 ab
30°C(3)	23,1667 a	9,8500 bc	23,5000 a	4,7167 cd	13,8333 b	7,1833 cd	3,8333 d

* Letras maiúsculas usadas na comparação entre médias gerais dos fatores. (vertical)

Letras minúsculas usadas para temperaturas dentro dos isolados estudados e isolados dentro das temperaturas testadas. (horizontal)

Tabela 12. Resultados da análise estatística para diâmetro médio das colônias (cm) dos sete isolados testados nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Isolados	Tratamentos	T E M P E R A T U R A S			Média geral para isolados
		22°C (1)	26°C (2)	30°C (3)	
196	1	2,3417a	2,4917a	2,4583a	2,43056A
197	2	1,3667 b	1,4883ab	1,6167a	1,48889 E
210	3	2,1667 b	2,3833a	2,4250a	2,32500AB
258	4	1,2250 b	1,5083a	1,6417a	1,45833 E
268	5	1,9167a	2,0750a	1,5500 b	1,84722 D
341	6	2,1500a	2,2250a	2,3250a	2,23333 BC
478	7	2,1333a	2,2917a	1,9083 b	2,11111 C
Média geral p/ temperaturas		1,90000 B	2,06548A	1,98929A	

Temperatu ras	I S O L A D O S								
	196 (1)	197 (2)	210 (3)	258 (4)	268 (5)	341 (6)	478 (7)		
22°C(1)	2,3417a	1,3667	c	2,1667ab	1,2250	c	1,9167 b	2,1500ab	2,1333ab
26°C(2)	2,4917a	1,4833	d	2,3833ab	1,5083	d	2,0750 c	2,2250 bc	2,2917abc
30°C(3)	2,4583a	1,6167	c	2,4250a	1,6417	c	1,5500 c	2,3250a	1,9083 b

* Letras maiúsculas usadas na comparação entre médias gerais dos fatores. (vertical)

Letras minúsculas usadas para temperaturas dentro dos isolados estudados e isolados dentro das temperaturas testadas. (horizontal)

4.4. Determinação das dimensões dos conídios

As dimensões médias dos conídios dos sete isolados de *Beauveria* spp. e respectiva análise de variância, encontram-se na Tabela 13.

Considerando-se os valores médios obtidos pode-se verificar que as dimensões correspondem aquelas mencionadas na literatura por SAMSON (1981) e MACLEOD (1954). Observa-se também que, comparando-se os isolados, as maiores diferenças entre as duas dimensões foram obtidas para os isolados 210 e 478, registrados no banco de patógenos de onde foram obtidos como sendo *B. brongniartii*. O isolado 258 também classificado como *B. brongniartii*; de modo geral, apresentou conídios mais arredondados e com dimensões mais próximas as daqueles classificados como *B. bassiana*.

Tabela 13. Dimensões dos conídios de diferentes isolados de *Beauveria* spp., obtidos em meio de cultura ABD mais antibiótico. Temperatura de 26°C e fotofase de 16 horas. (tamanho em μ).

Isolados	Comprimento médio (μ)	Tukey 5%	Largura média (μ)	Tukey 5%
196	2,22	B	2,03	A
197	2,08	C	1,82	C
210	2,24	B	1,66	D
258	2,05	C	1,81	C
268	2,09	C	1,86	BC
341	1,98	C	1,77	C
478	2,42	A	1,97	AB

4.5. Padrões eletroforéticos dos sistemas de alfa-esterases dos isolados de Beauveria spp.

Para se determinar os padrões eletroforéticos dos isolados de *Beauveria* spp. utilizou-se a metodologia descrita no item 3.2.5. Os desenhos esquemáticos dos referidos padrões encontram-se na Figura 4.

Considerando-se o conjunto total das bandas os isolados diferem entre si, em número e mobilidade, uma vez que as letras obedecem o caminhamento relativo. No entanto, verifica-se que as bandas o e p estão presentes em todos os isolados sugerindo que essas isoenzimas possam ser consideradas como característica de grupo. Verifica-se também, através dessa figura, que todos os isolados, excetuando-se o 268, apresentaram o conjunto de bandas o, p, d, e. O isolado 268, por sua vez, foi o que apresentou menor produção de amilase e protease.

Figura 4. Zimogramas do sistema alfa-esterases de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (isolados 196, 197, 268 e 341) e *Beauveria brongniartii* (isolados 210, 258 e 478).

Pela análise conjunta de todas as características dos 7 isolados avaliados (Tabela 14), verifica-se que o isolado 196 foi o que reuniu um melhor conjunto de características, principalmente levando-se em consideração, a origem, virulência, crescimento e produção de conídios em meio ABD.

Tabela 14. Comportamento dos 7 isolados de *Beauveria* spp. quanto a patogenicidade, produção de exoenzimas, crescimento e esporulação.

Fatores considerados	I S O L A D O S						
	196	197	210	258	268	341	478
PATOGENICIDADE							
LT-50	+++	+	++	+	++	+++	+++
Mortalidade							
Total	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS							
Lipase	-	-	-	-	-	-	+++
Amilase	++	+++	+	++	+	++	+
Protase pH = 7	++	++	++	+++	+	+	++
CRESCIMENTO							
Média para isolados	+++	+	+++	+	++	+++	+++
ESPORULAÇÃO							
Média para isolados	+++	++	+++	++	+++	++	++

+ índice mais baixo

++ índice médio

+++ índice mais alto

- não detectado

4.6. Experimento I. Bioensaios para avaliação da interação entre fungo-parasitóides-praga.

Os resultados dos 10 bioensaios de interação realizados serão apresentados e discutidos dois a dois devido às mudanças na metodologia descritas no item 3.1.4., referentes à idade das lagartas de *Diatraea* utilizadas nos bioensaios, modificações na dieta de alimentação dessas lagartas e no número de larvas dos dípteros utilizadas para inoculação. Assim, foram relacionados os resultados dos 10 bioensaios de interação entre os parasitóides de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., desenvolvidos nas temperaturas de 22, 26 e 30°C e que foram denominados de Experimento I, (Tabelas 15 a 22 e figuras 5 a 7).

Foram registrados os dados de porcentagem média de mortalidade da praga devida aos diferentes tratamentos, nas três temperaturas estudadas (Tabela 15). Anotou-se o quadro de médias gerais da análise estatística, com os respectivos valores do teste de Tukey, F e CV% (Tabela 16).

Fazendo-se uma análise dessas tabelas observa-se que o fator tratamento foi significativamente diferente em todas as montagens e temperaturas estudadas.

De maneira geral, para as três temperaturas,

Tabela 15. Porcentagem média de mortalidade de lagartas de *Diatraea saccharalis*, submetidas ao tratamento com *B.bassiana*, inoculadas com os parasitóides e pela associação de ambos os agentes em diferentes temperaturas.

Fases	Tratamentos	Temperaturas				
		26°C		22°C	30°C	
		(1e2)**	3e4	5e6	7e8	9e10
1. (Fungo inoculado 1 dia após a inoculação do parasitóide)	C1 (não inoculadas)	0	0	0	0	0
	C2 (<i>Beauveria</i>)	67,0	52,0	95,0	75,0	65,0
	C3 (<i>Cotesia</i>)	87,0	80,0	77,0	80,0	75,0
	C4 (C.f.+B.b.)*	92,0	85,0	91,0	100,0	97,0
	C5 (<i>Metagonistylum</i>)	16,5	56,5	63,0	60,0	50,0
	C6 (M.m.+B.b.)	81,5	83,5	91,5	86,0	80,0
	C7 (<i>Paratheresia</i>)	47,0	70,0	70,0	87,0	63,0
	C8 (P.c.+B.b.)	83,5	90,0	98,0	92,0	92,0
2. (Fungo inoculado 3 dias após a inoculação do parasitóide)	C1 (não inoculadas)	0	0	0	0	0
	C2 (<i>Beauveria</i>)	75,0	66,5	90,0	83,5	73,5
	C3 (<i>Cotesia</i>)	90,0	83,5	56,5	76,5	68,5
	C4 (C.f.+ B.b.)	100,0	91,5	96,5	95,0	95,0
	C5 (<i>Metagonistylum</i>)	25,0	58,5	63,0	61,5	51,5
	C6 (M.m.+B.b.)	85,0	92,0	93,0	86,5	100,0
	C7 (<i>Paratheresia</i>)	58,5	66,5	66,5	85,0	62,0
	C8 (P.c.+B.b.)	92,0	94,5	99,5	85,0	90,0
3. (Fungo inoculado 6 dias após a inoculação do parasitóide)	C1 (não inoculadas)	0	0	0	0	0
	C2 (<i>Beauveria</i>)	72,0	65,0	86,5	71,5	76,5
	C3 (<i>Cotesia</i>)	90,0	81,5	60,0	82,0	87,0
	C4 (C.f.+B.b.)	92,0	83,5	93,0	91,5	98,5
	C5 (<i>Metagonistylum</i>)	28,5	58,5	68,0	85,0	35,0
	C6 (M.m.+B.b.)	88,5	90,0	98,0	98,5	83,0
	C7 (<i>Paratheresia</i>)	70,0	92,0	83,5	85,0	36,5
	C8 (P.c.+B.b.)	98,5	100,0	88,0	90,0	93,0

*B.b. *Beauveria bassiana*

C.f. *Cotesia flavipes*

M.m. *Metagonistylum minense*

P.c. *Paratheresia claripalpis*

** Números referentes as montagens do Experimento I.

Tabela 16. Resultados da análise estatística para porcentagem média de mortalidade de lagartas de *D.saccharalis* submetidas ao tratamento com *B.bassiana* inoculadas com os parasitóides e pela associação de ambos os agentes em diferentes temperaturas.

	Temperaturas				
	26°C			22°C	30°C
	1e2	3e4	5e6	7e8	9e10
Condição 2	71,31 cd	62,69 bc	91,11 ab	77,14 bc	71,99 cd
Condição 3	89,76 ab	81,78 abc	65,21 c	79,74 bc	78,36 bc
Condição 4	97,35 a	88,96 abc	94,83 ab	97,71 a	97,91 a
Condição 5	22,94 e	57,96 c	65,90 c	69,70 c	45,26 e
Condição 6	85,25 bc	91,22 ab	94,90 ab	92,82 ab	91,59 ab
Condição 7	58,72 d	78,94 abc	75,00 bc	86,02 abc	54,13 de
Condição 8	93,23 ab	96,64 a	97,21 a	91,09 ab	93,14 ab
Fase 1	70,91 a	75,75 a	86,82 a	85,80 a	77,52 a
Fase 2	79,75 a	83,19 a	85,36 a	84,05 a	81,57 a
Fase 3	80,65 a	85,39 a	85,16 a	88,77 a	78,16 a
Teste F para condições	39,38**	5,42**	9,49**	7,78**	21,50**
Teste F para fases	3,76*	1,44NS	0,10NS	1,01NS	0,56NS
Teste F para interação	1,03NS	0,52NS	1,01NS	1,55NS	2,28*
CV %	11,31	17,62	13,42	10,96	12,33

22, 26 e 30°C, nos tratamentos em que fungo e o parasitóide foram aplicados, a mortalidade foi maior que nos tratamentos onde apenas um dos agentes foi utilizado. Esse fato indica uma interação positiva entre o patógeno e o inimigo natural.

A mortalidade devida ao fungo na condição 2 foi na maioria dos casos, inferior a 80%, porém, esse fato era esperado pois utilizou-se em todos os experimentos a concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/ml de suspensão o que pode ser considerada uma dosagem relativamente baixa. Essa dosagem apesar de teoricamente poder proporcionar até 100% de mortalidade na população de lagartas utilizadas no experimento, não proporcionou o contato de todas as lagartas com uma grande quantidade de conídios e assim algumas delas escaparam a infecção ou foram infectadas tardiamente.

A dosagem de $1,0 \times 10^7$ conídios/ml foi intencionalmente utilizada, acreditando-se que não haveria 100% de mortalidade das lagartas, possibilitando nos tratamentos com os dois agentes, o desenvolvimento de alguns parasitóides, dessa forma seria possível a avaliação de alguns parâmetros biológicos desses insetos. Também em aplicações de inseticidas no campo dificilmente se consegue 100% de mortalidade da praga, e os insetos sobreviventes possibilitam o desenvolvimento de inimigos naturais.

Quanto a mortalidade obtida nas condições 3,

5 e 7 relativa aos tratamentos com parasitóides verifica-se que *Cotesia flavipes* é o mais eficiente entre eles proporcionando mortalidade superior a 75% na maioria dos casos. Para as condições 5 e 7 o aumento de uma para duas larvas do parasitóide inoculadas por lagartas de *D. saccharalis* proporcionou um aumento do parasitismo, como podemos verificar comparando-se as médias das montagens 1 e 2 com as médias das outras 8 montagens do Experimento I.

Verifica-se também, (Tabela 5), que nas diferentes fases, todas as 8 condições comportaram-se de maneira semelhante não ocorrendo diferenças significativas entre fases conforme demonstrado pela análise de variância (Tabela 16). Esse fato demonstrou que o fungo *Beauveria bassiana* colonizou as lagartas de forma muito rápida, sendo que, a maior ou menor idade larval do parasitóide por ocasião da infecção do hospedeiro pelo fungo não influenciou a sobrevivência do parasitóide. Pode-se considerar, portanto, que *B.bassiana* é um patógeno mais virulento que o *Metarhizium anisopliae*, considerando-se os resultados obtidos por FOLEGATTI & ALVES (1987).

Comparando-se as montagens 1 a 4, com as demais, verifica-se que a mudança de dieta, não afetou a suscetibilidade da lagarta de *D. saccharalis*, sendo que o comportamento geral dos tratamentos foi semelhante nas montagens realizadas com as lagartas provenientes de ambas as fontes de alimento.

As temperaturas utilizadas também não influenciaram de modo geral, a superioridade dos tratamentos de associação dos dois agentes com relação aos demais. No entanto, verifica-se (Tabelas 15 e 16), que os parasitóides *Metagonistylum minense* e *Paratheresia claripalpis* tiveram sua eficiência estatisticamente diminuída quando comparadas as médias das montagens 9 e 10 (30°C) com as médias das montagens anteriores que foram realizadas com a mesma metodologia, porém, em diferentes temperaturas. Esse fato deve estar relacionado com a queda de umidade mais rápida ocorrida na temperatura de 30°C, fator que influencia de maneira considerável o desenvolvimento desses parasitóides. Verifica-se (Tabela 16) que essa inferioridade dos tratamentos com *M. minense* e *P. claripalpis* foi confirmada através do teste F, ao nível de 5% de probabilidade que detectou diferenças significativas para a interação dos fatores tratamento x fase na temperatura de 30°C. Ao nível de 5% de probabilidade o desdobramento da interação dos fatores, indicou diferenças para médias de tratamentos dentro de fases e principalmente para a fase 3, onde ficou melhor evidenciada a inferioridade das condições 5 e 7.

Observaram-se (Figura 5) as mortalidades totais obtidas nas condições 2, 3 e 4, e também as mortalidades devido a cada um dos agentes de controle, dentro da condição 4 e ainda a porcentagem de insetos que apresentou sinais de ambos ao mesmo tempo, nas três temperaturas estudadas. Veri-

Cotesia flavipes-22°C

Cotesia flavipes-26°C

Cotesia flavipes-30°C

Figura 5. Mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* do Experimento I, devido à ação de *C. flavipes* (C3), de *B. bassiana* (C2) e pela associação dos dois agentes no mesmo tratamento (C4), pela ação somente do parasitóide dentro da C4 (P d C4), pela ação somente do fungo dentro da C4 (F d C4), e ainda pela ação de ambos os agentes sobre o mesmo inseto, nas três fases e temperaturas estudadas.

fica-se mais uma vez a superioridade da condição 4 onde fungo e parasitóide estavam presentes. Esses resultados, concordam com os encontrados por FOLEGATTI & ALVES (1987) como também por LANDA (1984) e podem ser explicados pelo relato por TANADA, 1975; e EL-SUFTY & FUHRER, 1981,

Através desses resultados observa-se também que, em alguns casos, tanto fungo quanto parasitóide desenvolveram-se no mesmo hospedeiro e nesses casos algumas larvas do parasitóide também foram infectadas pelo fungo como observado por SMITH et alii (1976) e FOLEGATTI & ALVES (1987), comprovando que *B.bassiana* não é um patógeno muito específico e ao contrário do que foi relatado por HALL(1982) para *V. lecanii* e o parasitóide *Encarsia formosa*, a sua coexistência com *C. flavipes* poderia se tornar problemática para o parasitóide. No entanto, deve-se lembrar que no campo os mecanismos utilizados para discriminação de hospedeiros infectados ou não por patógenos como aqueles relatados por BROBYN et alii (1988) podem ser utilizados pelos parasitóides, evitando esse tipo de interação negativa.

A pequena taxa de parasitismo obtida em todas as fases e temperaturas dentro da condição 4 foi provavelmente devida à competição desigual pelo hospedeiro ocorrida entre os dois inimigos naturais como foi também relatado por BURLEIGH (1975), KING & BELL (1978), LOAN (1981) e FOLEGATTI & ALVES (1987) para outros fungos entomopatogêni-

cos e que nesses exemplos, está diretamente ligada à idade do parasitóide no momento em que ocorre o contágio do hospedeiro com o patógeno como também foi relatado por BROBYN et alii (1988).

Foram observadas (Figura 6) as mortalidades totais obtidas nas condições 2, 5 e 6 e também as mortalidades devidas a cada um dos agentes de controle, dentro da condição 6 e ainda a porcentagem de insetos que apresentou sinais do fungo e parasitóide ao mesmo tempo, nas três temperaturas estudadas. Verifica-se nessa figura, que de maneira geral *M.minense* comportou-se da mesma forma que *C.flavipes*, isto é, também nos tratamentos em que esse parasitóide foi associado ao fungo *B.bassiana* para o controle de *D.saccharalis*, obteve-se maior porcentagem de mortalidade.

Observa-se (Figura 7) que as mortalidades totais obtidas nas condições 2, 7 e 8 e também as mortalidades devidas a cada um dos agentes de controle dentro da condição 8 e ainda a porcentagem de insetos que apresentou sinais do fungo e parasitóide ao mesmo tempo, nas três fases e temperaturas estudadas. Verifica-se ainda (Figura 7) que na separação das mortalidades devidas a cada um dos agentes de controle dentro da condição 8, fase 3, temperatura de 22°C, a mortalidade devida ao parasitóide foi bastante superior a mortalidade devida ao fungo diferindo do encontrado para as demais fases e temperaturas, que seguiram o observado para os outros parasitóides. Como esse foi um caso isolado, acredi-

Metagonistylum minense-22°C

Metagonistylum minense-26°C

Metagonistylum minense-30°C

Figura 6. Mortalidade de lagartas de *D.saccharalis* do Experimento I, devido a ação de *M.minense* (C5), de *B.bassiana* (C2), pela associação dos dois agentes no mesmo tratamento (C6), pela ação somente do parasitóide dentro de C6 (P d C6), pela ação somente do fungo dentro de C6 (F d C6) e ainda pela ação de ambos os agentes sobre o mesmo inseto, nas três fases e temperaturas estudadas.

Figura 7. Mortalidade de lagartas de *D.saccharalis* do Experimento I, devido a ação de *Paratheresia claripalpis* (C7), de *Beauveria bassiana* (C2), pela associação dos dois agentes no mesmo tratamento (C8), pela ação somente do parasitóide (Pd C8), pela ação somente do fungo (F d C8) e ainda pela ação de ambos os agentes sobre o mesmo inseto, nas três fases e temperaturas estudadas.

ta-se que ocorreu principalmente devido a falhas na metodologia de aplicação do fungo, ao invés de uma resposta do parasitóide com relação à condição submetida.

Observa-se também um maior número de casos onde houve o desenvolvimento do fungo e parasitóide no mesmo hospedeiro. Esse resultado pode ser explicado provavelmente pelo maior período pupal do parasitóide *P.claripalpis*, tornando-o mais suscetível ao fungo, nas condições do experimento.

Verifica-se (Tabelas 17 e 18) que para a temperatura de 22°C houve diferença significativa entre tratamentos, apenas para o parâmetro biológico duração da fase larval. Esta diferença talvez não deva ser considerada importante pois, a condição 4, que neste caso proporcionou um encurtamento da fase larval esteve representada por um número muito reduzido de parasitóides devido às desvantagens na competição com o fungo, e de acordo com HAM et alii (1983), esse fato não é ecologicamente importante. Por esse mesmo motivo nas duas últimas montagens do Experimento I realizadas a 26°C não foi possível realizar-se as análises estatísticas para duração das fases larval e pupal. Na temperatura de 26°C foram observadas diferenças significativas para as médias de fases e tratamentos das montagens 1 e 2 do parâmetro porcentagem de emergência de adultos. Na temperatura de 30°C

Tabela 17. Porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de *C.flavipes* em lagartas de *D.saccharalis* infectadas e não infectadas por *B.bassiana* nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Origens	Fases	Nº de indiví- duos	% de emergen- cia	Duração fase larval (dias)		Duração fase pupal (dias)	
				M	σ	M	σ
Temp. 22°C (7 e 8) *							
C ₃	1	47	98	15,32	3,10	8,17	0,90
	2	45	98	15,10	2,48	7,79	0,82
	3	47	95,5	15,22	2,70	8,70	1,32
C ₄	1	12	84,5	13,82	1,66	7,94	0,74
	2	05	87,5	12,92	0,64	7,50	2,65
	3	12	84,5	13,38	2,22	8,56	0,80
Temp. 26°C (1 e 2)							
C ₃	1	52	100	12,65	3,16	6,12	0,66
	2	54	100	12,87	2,69	6,08	0,78
	3	54	100	13,81	2,06	6,10	0,57
C ₄	1	16	100	14,32	2,68	6,56	0,70
	2	14	80,5	12,33	1,96	6,47	1,18
	3	09	77,2	14,10	1,70	5,60	0,60
Temp. 26°C (3 e 4)							
C ₃	1	48	100	13,90	3,89	6,08	0,94
	2	49	98	13,18	2,36	6,28	0,82
	3	47	97	15,77	3,10	6,22	0,90
C ₄	1	15	84	13,86	3,06	5,90	0,75
	2	17	100	14,05	3,72	5,66	1,12
	3	11	94,5	14,36	3,78	6,33	1,27
Temp. 26°C (5 e 6)							
C ₃	1	45	98	12,44	2,16	5,74	0,73
	2	34	100	13,00	1,68	5,58	0,76
	3	36	100	13,54	1,91	5,84	0,75
C ₄	1	5	100	13,38	1,26	5,12	0,50
	2	3	100	13,67	1,53	5,67	0,58
	3	8	94	12,72	0,53	5,50	0,0
Temp. 30°C (9 e 10)							
C ₃	1	45	100	10,64	1,98	5,08	0,59
	2	39	92,6	11,48	1,55	5,12	0,61
	3	52	100	12,63	1,66	5,32	0,84
C ₄	1	16	95,5	11,02	1,00	4,96	0,49
	2	12	85,0	11,87	1,90	5,35	0,74
	3	17	68,5	11,76	1,40	5,56	0,50

* Números referentes as Montagens do Experimento I

Tabela 18. Resultados da análise estatística para porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de *C.flavipes* em lagartas de *D.saccharalis* infectadas e não infectadas por *B.bassiana* nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

	% DE EMERGÊNCIA				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 3	98,62a	100,00a	99,44a	99,89a	99,18a
Condição 4	87,95a	90,66 b	96,31a	90,06a	88,46 b
Fase 1	93,84a	100,00a	78,23a	99,75a	99,42a
Fase 2	96,75a	77,24 b	87,16a	85,35a	92,33a
Fase 3	92,54a	76,06 b	81,61a	99,21a	91,34a
Teste F p/ condições	3,5028NS	35,0825**	2,2525NS	1,1573NS	6,7854*
Teste F p/ fases	0,2029NS	8,8227*	1,3106NS	0,6586NS	2,1067NS
Teste F p/ interação	0,1030NS	8,8227*	3,7133NS	0,9607NS	3,1679NS
CV%	16,407	6,417	9,517	33,180	12,591

	DURAÇÃO FASE LARVAL (dias)				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 3	15,21a	13,11a	14,29a	-	11,58a
Condição 4	13,37 b	13,58a	14,09a	-	11,55a
Fase 1	14,57a	13,48a	13,88a	-	10,82a
Fase 2	14,00a	12,60a	13,62a	-	11,68a
Fase 3	14,30a	13,96a	15,06a	-	12,20a
Teste F p/ condições	9,6643*	0,6947NS	0,0371NS	-	0,0078NS
Teste F p/ fases	0,3027NS	1,9606NS	0,7566NS	-	4,5121NS
Teste F p/ interação	0,1064NS	1,2767NS	0,4218NS	-	1,2301NS
CV%	7,187	7,369	12,459	-	5,648

continua

	DURAÇÃO FASE PUPAL (dias)				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 3	8,22a	6,10a	6,19a	-	5,17a
Condição 4	8,00a	6,21a	5,96a	-	5,29a
Fase 1	8,05a	6,34a	5,98a	-	5,02a
Fase 2	7,64a	6,27a	5,97a	-	5,24a
Fase 3	8,63a	5,85a	6,28a	-	5,44a
Teste F p/ condições	0,1253NS	0,5492NS	1,0090NS	-	0,3524NS
Teste F p/ fases	0,8542NS	3,9611NS	0,7619NS	-	1,3268NS
Teste F p/ interação	0,0049NS	4,0302NS	0,8826NS	-	0,3118NS
CV%	13,270	4,302	6,476	-	6,970

também houve diferenças significativas para esse mesmo parâmetro.

Comparando-se as porcentagens de emergência de *C. flavipes* na condição 3 com as porcentagens obtidas na condição 4 em todas as temperaturas estudadas (Tabela 17), verifica-se que as médias da C_4 tenderam a serem inferiores às médias de C_3 , apesar dessas diferenças não terem sido significativas para todos os casos. Esse fato, mais uma vez, realça a existência de um efeito negativo do fungo sobre esse parasitóide, como observado por BELL et alii (1974) e FOLEGATTI & ALVES (1987), para outras associações fungo-parasitóide.

Verifica-se que as larvas, pupas e adultos de *M. minense*, de um modo geral, foram pouco afetados por *B. bassiana*, com relação à porcentagem de emergência de adultos e duração das fases larval e pupal, pois nenhuma diferença obtida foi considerada significativa estatisticamente (tabela 19 e 20). No entanto, deve-se observar que em todas as montagens obtiveram-se poucos parasitóides na condição 6, principalmente nas montagens 5 e 6 na temperatura de 26°C e para a temperatura de 30°C, o que mais uma vez impediu a realização das análises estatísticas.

Tabela 19. Porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de *M.minense* em lagartas de *D.saccharalis* infectadas e não infectadas por *B.bassiana* nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Condições	Fases	Nº de indivíduos	% de emergência	Duração Fase Larval (dias)		Duração Fase pupal (dias)	
				M	σ	M	σ
Temp. 22°C (7e8)*							
C ₅	1	31	86,5	13,04	2,42	13,09	2,09
	2	30	80,5	13,53	1,74	12,21	0,98
	3	43	84,0	12,71	2,50	12,66	1,08
C ₆	1	10	93,0	13,08	1,89	12,55	0,94
	2	05	71,0	12,50	1,73	12,00	1,20
	3	21	81,5	11,47	1,40	12,32	0,91
Temp. 26°C (1 e 2)							
C ₅	1	10	100	15,71	4,08	11,16	1,31
	2	12	80,4	15,00	3,48	10,25	0,82
	3	17	91,5	14,00	2,79	10,30	1,03
C ₆	1	09	91,5	14,25	2,32	10,28	0,48
	2	08	93,0	14,25	2,07	9,66	1,02
	3	04	83,5	11,50	1,41	10,25	0,35
Temp. 26°C (3 e 4)							
C ₅	1	32	93,5	12,46	3,00	10,51	1,63
	2	30	86,0	13,94	3,70	10,60	1,46
	3	31	90,0	13,26	3,66	10,16	1,47
C ₆	1	12	88,5	11,14	1,44	10,20	1,70
	2	19	86,5	14,61	3,72	10,48	2,20
	3	26	86,0	11,12	2,09	10,24	1,31
Temp. 26°C (5 e 6)							
C ₅	1	34	90	12,03	2,49	10,33	1,43
	2	33	84,5	11,96	2,08	10,06	0,98
	3	32	75,0	12,21	2,24	9,84	0,90
C ₆	1	4	80,0	13,50	3,00	11,00	0,82
	2	4	87,5	9,33	1,53	10,16	2,08
	3	21	75,0	10,32	0,93	11,08	1,14
Temp. 30°C (9e10)							
C ₅	1	26	78,6	10,15	2,16	9,15	1,08
	2	27	73,2	10,90	2,59	9,06	0,80
	3	18	65,3	11,72	1,85	9,72	1,18
C ₆	1	7	64,4	10,65	1,70	9,00	0,71
	2	15	77,2	11,75	2,60	9,95	1,76
	3	5	66,7	9,80	0,45	8,80	0,45

* Números referente as montagens do Experimento I

Tabela 20. Resultados da análise estatística para porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de *M. minense* em lagartas de *D. saccharalis* infectadas e não infectadas por *B. bassiana* nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

	% DE EMERGÊNCIA				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 5	84,27a	95,12a	93,61a	84,29a	72,69a
Condição 6	84,88a	94,50a	89,23a	72,03a	69,43a
Fase 1	92,15a	96,87a	93,73a	61,56a	71,79a
Fase 2	76,35a	89,88a	89,80a	89,64a	75,43a
Fase 3	83,45a	93,43a	90,87a	81,01a	66,00a
Teste F p/ condições	0,0079NS	0,0066NS	0,2319NS	0,3003NS	1,3620NS
Teste F p/ fases	1,9051NS	0,5620NS	0,0697NS	0,5332NS	1,6995NS
Teste F p/ interação	0,9322NS	0,6924NS	0,0774NS	1,0040NS	0,8192NS
CV%	13,993	22,221	22,205	43,466	30,904
	DURAÇÃO FASE LARVAL (dias)				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 5	13,09a	14,90a	13,22a	-	-
Condição 6	12,35a	13,33a	12,29a	-	-
Fase 1	13,06a	14,98a	11,80a	-	-
Fase 2	13,02a	14,62a	14,27a	-	-
Fase 3	12,09a	12,75a	12,19a	-	-
Teste F p/ condições	0,6596NS	1,6977NS	0,5007NS	-	-
Teste F p/ fases	0,4729NS	1,3185NS	1,3630NS	-	-
Teste F p/ interação	0,1828NS	0,1779NS	0,4026NS	-	-
CV%	12,517	14,782	17,881	-	-

continua

	DURAÇÃO FASE PUPAL (dias)				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 5	12,66a	10,57a	10,42a	–	–
Condição 6	12,29a	10,06a	10,30a	–	–
Fase 1	12,82a	10,72a	10,35a	–	–
Fase 2	12,11a	9,96a	10,54a	–	–
Fase 3	12,49a	10,27a	10,20a	–	–
Teste F p/ condições	0,4303NS	5,2766NS	0,4417NS	–	–
Teste F p/ fases	0,5377NS	4,0236NS	1,2197NS	–	–
Teste F p/ interação	0,0282NS	1,2546NS	0,4101NS	–	–
CV%	7,798	3,703	2,976	–	–

Pelos dados obtidos (Tabelas 21 e 22) observa-se que as diferenças entre as condições 7 e 8, também não são muito evidentes, indicando que *P. claripalpis* também parece ser menos afetado pelo fungo do que *C.flavipes*. Obteve-se significância estatística apenas para as médias de fase do parâmetro duração da fase larval, na temperatura de 30°C, e para médias de tratamentos do parâmetro duração da fase pupal, na temperatura de 22°C. Apesar de mais uma vez, os dados serem referentes a poucos insetos, essa menor suscetibilidade ao fungo está generalizada nas três temperaturas, para ambos, *M.minense* e *P.claripalpis*.

Tabela 21. Porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de *P.claripalpis* em lagartas de *D.saccharalis* infectadas e não infectadas por *B.bassiana* nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Condições	Fases	Nº de indivíduos	% de emergência	Duração fase larval (dias)		Duração fase pupal (dias)	
				M	σ	M	σ
Temp. 22°C (7 e 8)*							
C ₇	1	32	61,5	13,31	1,67	23,68	1,25
	2	29	57,0	12,55	2,43	24,87	2,40
	3	35	68,0	11,93	2,01	25,06	2,33
C ₈	1	09	60,0	12,08	1,94	22,42	1,26
	2	10	66,5	12,20	3,50	21,60	2,09
	3	26	55,5	11,32	1,62	25,06	1,36
Temp. 26°C (1 e 2)							
C ₇	1	14	50,0	13,05	1,59	19,45	1,38
	2	20	59,0	13,76	2,24	19,44	1,51
	3	25	59,5	14,44	2,61	19,21	1,33
C ₈	1	09	73,5	13,75	2,53	17,75	2,03
	2	11	83,0	13,40	3,47	19,23	2,17
	3	06	72,0	11,62	3,94	18,38	2,66
Temp. 26°C (3 e 4)							
C ₇	1	30	73,5	11,04	2,04	17,07	1,62
	2	26	65,5	10,95	2,36	17,86	1,59
	3	31	56,5	11,54	1,88	19,52	2,65
C ₈	1	13	58,5	9,94	1,94	20,22	2,36
	2	18	51,0	10,57	1,68	19,10	2,40
	3	20	41,5	10,28	1,68	17,61	1,99
Temp. 26°C (5 e 6)							
C ₇	1	29	67,5	11,48	1,69	18,42	2,08
	2	30	75,0	12,03	2,05	18,95	1,30
	3	31	62,0	12,06	1,70	19,91	1,60
C ₈	1	6	77,5	9,20	0,89	20,30	1,52
	2	7	64,0	9,71	1,60	19,14	1,57
	3	16	61,0	11,16	0,92	19,18	1,23
Temp. 30°C (9 e 10)							
C ₇	1	30	68,4	10,40	1,26	15,45	0,88
	2	28	67,3	10,68	1,43	16,32	1,04
	3	20	71,5	12,56	1,14	16,82	0,70
C ₈	1	9	71,0	10,90	1,98	14,92	1,15
	2	11	63,9	10,43	1,61	15,54	0,68
	3	19	56,5	11,50	1,72	15,76	0,62

* Números referentes as montagens do Experimento I.

Tabela 22. Resultados da análise estatística para porcentagens de emergência de adultos e duração média das fases larval e pupal de *P.claripalpis* em lagartas de *D.saccharalis* infectadas e não infectadas por *B.bassiana* nas temperaturas de 22, 26 e 30 °C.

	% DE EMERGÊNCIA				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 7	62,25a	56,30a	65,43a	68,65a	69,24a
Condição 8	61,11a	80,18a	50,25a	56,88a	64,28a
Fase 1	60,77a	62,25a	66,41a	78,56a	69,94a
Fase 2	62,40a	71,85a	58,35a	47,00a	66,03a
Fase 3	61,87a	72,27a	48,79a	61,50a	64,32a
Teste F p/ condições	0,0424NS	3,8681NS	5,6815NS	0,3060NS	0,7670NS
Teste F p/ fases	0,0300NS	0,2771NS	2,5572NS	0,7666NS	0,3488NS
Teste F p/ interação	1,4691NS	0,0028NS	0,0035NS	1,1893NS	0,8797NS
CV%	10,931	23,469	12,968	41,770	10,877
	DURAÇÃO FASE LARVAL (dias)				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 7	12,60a	13,75a	11,17a	-	11,21a
Condição 8	11,87a	12,92a	10,26a	-	10,94a
Fase 1	12,69a	13,40a	10,49a	-	10,65 b
Fase 2	12,37a	13,58a	10,76a	-	10,55 b
Fase 3	11,63a	13,03a	10,91a	-	12,08a
Teste F p/ condições	1,1544NS	0,6483NS	0,7542MS	-	0,6232NS
Teste F p/ fases	0,8708NS	0,0975NS	0,0550NS	-	7,9478*
Teste F p/ interação	0,1442NS	1,0207NS	0,0661NS	-	1,7778NS
CV%	9,598	13,360	16,931%	-	5,282

continua

	DURAÇÃO FASE PUPAL (dias)				
	22°C(7e8)	26°C(1e2)	26°C(3e4)	26°C(5e6)	30°C(9e10)
Condição 7	24,54 a	19,37a	18,15a	-	16,20a
Condição 8	23,03 b	18,45a	18,98a	-	15,40a
Fase 1	23,05a	18,60a	18,64a	-	15,19a
Fase 2	23,23a	19,33a	18,48a	-	15,93a
Fase 3	25,06a	18,79a	18,57a	-	16,29a
Teste F p/ condições	8,8889*	0,5724NS	1,0436NS	-	4,0720NS
Teste F p/ fases	6,4200*	0,1305NS	0,0138NS	-	2,7363NS
Teste F p/ interação	3,5160	0,1275NS	3,3192NS	-	0,1470NS
CV%	3,697	11,117	7,565	-	4,291

4.7. Experimento II. Inoculação de Beauveria bassiana
(Bals.) Vuill. em pupas de Cotesia flavipes (Cam.)

Os resultados da exposição de pupas de *C. flavipes* ao fungo *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios/ml de suspensão foram anotados (Tabela 23). Verifica-se que o fungo não teve nenhuma ação sobre as pupas do parasitóide; apesar da inoculação ter sido feita com um pulverizador, garantindo uma boa distribuição e aderência dos conídios aos pupários. Acredita-se que após os casulos terem sido produzidos pela larva de *C. flavipes*, dificilmente os conídios conseguem penetrá-lo para causar infecção e, consequentemente, a diminuição da porcentagem de emergência dos adultos. No entanto, observou-se nos bioensaios do experimento I que alguns casulos tornaram-se rosados, apresentando dessa forma, sinais da contaminação pelo patógeno. Essa contaminação provavelmente se deu quando as larvas do parasitóide deixaram o corpo do hospedeiro para então formarem os casulos.

Tabela 23. Efeito da exposição de pupas de *C.flavipes* ao fungo *B.bassiana* na dosagem de 10^7 conídios/ml.

Tempe- ratura (°C)	Condições	N° casu- los ex- postos	Total de adultos ob- tidos		Emergência %	% de insetos infectados
			♂	♀		
22	T ₁ tratamento	385	126	230	92,5	0
	T ₂ testemunha	395	159	187	87,6	0
26	T ₃ tratamento	404	105	265	91,6	0
	T ₄ testemunha	349	109	224	95,4	0
30	T ₅ tratamento	374	122	212	89,3	0
	T ₆ testemunha	412	121	255	91,2	0

4.8. Experimento III. Inoculação de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. em pupas de Metagonistylum minense (Townsend) e Paratheresia claripalpis (Wulp.).

O efeito da exposição de pupas de Metagonistylum minense e Paratheresia claripalpis ao fungo Beauveria bassiana na concentração de 10^7 conídios/ml de suspensão encontra-se nas Tabelas 24 e 25, respectivamente. Estes inimigos naturais de D. saccharalis, no estágio pupal mostraram-se também imunes ao fungo B. bassiana. Provavelmente, as pupas infectadas que foram observadas nos tratamentos com associação dos dois agentes foram resultado de ferimentos durante as avaliações do experimento, pois os pupários intactos mostraram ser, também neste caso, uma eficiente proteção contra a penetração do fungo.

As larvas desses parasitóides, assim como as de C. flavipes, ao deixarem o corpo das lagartas para se transformarem em pupas passam por um período de suscetibilidade. Porém, como esse período é relativamente curto, principalmente para a espécie M. minense (menor que 24 h.), apenas uma pequena porcentagem de larvas do parasitóide foi infectada durante todos os tratamentos com associação dos dois agentes, apesar de estarem em contato com um ambiente contaminado. Esse fato, provavelmente, se assemelha ao que ocorre em condições naturais.

Tabela 24. Efeito da exposição de pupas de *M.minense* ao fungo *B.bassiana* na dosagem de 10^7 conídios/ml.

Temperatura (°C)	Condições	Nº de pupas expostas	Total de pu- pas viáveis	Emergência %	% de insetos infectados
22	T ₁ tratamento	50	43	86	0
	T ₂ testemunha	50	42	84	0
26	T ₃ tratamento	50	41	82	0
	T ₄ testemunha	50	45	90	0
30	T ₅ tratamento	50	40	80	0
	T ₆ testemunha	50	38	76	0

Tabela 25. Efeito da exposição de pupas de *P.claripalpis* ao fungo *B.bassiana* na dosagem de 10^7 conídios/ml.

Temperatura (°C)	Condições	Nº de pupas expostas	Total de pu- pas viáveis	Emergência	% de insetos infectados
22	T ₁ tratamento	50	48	96	0
	T ₂ testemunha	50	46	92	0
26	T ₃ tratamento	50	45	90	0
	T ₄ testemunha	50	46	92	0
30	T ₅ tratamento	50	41	82	0
	T ₆ testemunha	50	42	84	0

4.9. Experimento IV. Inoculação de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. em adultos de Cotesia flavipes (Cm.).

Os resultados da exposição de adultos de C. flavipes ao fungo B. bassiana na concentração de 10^7 conídios/ml de suspensão (Tabela 26), demonstraram que o tratamento foi patogênico aos parasitóides, tendo colonizado insetos sob as 3 temperaturas. No entanto, sabe-se que Beauveria bassiana cresce saprofiticamente e, por conseguinte, fica difícil determinar se os insetos foram colonizados e mortos pelo fungo ou se a colonização dos insetos se deu após a sua morte por outras causas. Sabendo-se que C. flavipes é um parasitóide pequeno, foi necessário realizar-se rapidamente o tratamento de desinfestação após a sua morte para que não houvesse uma total desidratação do inseto, e esse fato colocou em dúvida a eficiência do tratamento.

Tabela 26. Efeito da exposição de adultos de *C. flavipes* ao fungo *B. bassiana* na dosagem de 10^7 conídios/ml, (Experimento IV).

Temperatura (° C)	Condições	N.º de insetos expostos	% mortalidade acumulada após			% de insetos infectados
			24h	36h	48h	
22	T ₁ tratamento	389	-	-	97,7	100
	T ₂ testemunha	375	-	-	97,1	0
26	T ₃ tratamento	403	-	95,0	-	99,2
	T ₄ testemunha	363	-	99,4	-	0
30	T ₅ tratamento	395	96,7	-	-	99,2
	T ₆ testemunha	391	91,3	-	-	0

4.10. Experimento V. Inoculação de conídios de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. diretamente sobre adultos de Cotesia flavipes (Cam.) recém-mortos.

Verifica-se (Tabela 27) que os insetos mortos quando pulverizados diretamente com a suspensão de conídios podem servir como substrato para o desenvolvimento dos conídios do fungo. Porém as porcentagens de insetos que proporcionaram essas condições variaram de 8 a 20%, sendo bem inferiores as obtidas no experimento IV, mostrando que a infecção ocorreu no inseto vivo e que a metodologia utilizada foi eficiente para eliminar a contaminação externa.

4.11. Experimento VI. Contato de adultos recém-mortos de Cotesia flavipes (Cam.) com a superfície de um recipiente contaminado por B. bassiana (Bals.) Vuill.

Esse experimento apesar de ter sido realizado utilizando-se a mesma metodologia do experimento com os insetos vivos, não evidenciou nos insetos colocados nos recipientes inoculados, nenhum sinal de infecção, demonstrando que a contaminação se deu pela movimentação dos insetos vivos dentro do recipiente, e portanto a mortalidade obtida e confirmada pelo plaqueamento no experimento IV, pode ser mais uma vez confirmada.

Tabela 27. Efeito da aplicação de conídios de *B. bassiana* sobre adultos recém mortos de *C.flavipes*, (Experimento V) .

Temperatura (°C)	Condições	Nº de insetos expostos	% de mortalida- de confirmada
22	T ₁ tratamento	330	8,5
	T ₂ testemunha	310	0
26	T ₃ tratamento	354	20
	T ₄ testemunha	340	0
30	T ₅ tratamento	372	16
	T ₆ testemunha	310	0

4.12. Experimento VII. Inoculação de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. em adultos de Metagonistylum minense (Tawns.) e Paratheresia claripalpis (Wulp.).

O efeito da exposição de adultos de Metagonistylum minense (Tows.) e Paratheresia claripalpis (Wulp.) encontram-se nas tabelas 28 e 29. Os adultos desses parasitóides igualmente aos de C.flavipes também se mostraram suscetíveis a B.bassiana, embora a mortalidade pelo fungo tenha sido confirmada apenas em uma pequena porcentagem de insetos, indicando nesse caso, uma menor suscetibilidade dos parasitóides da Ordem Díptera, ou o que também é provável, uma menor eficiência de inoculação da metodologia utilizada no Experimento VII.

De maneira semelhante aos resultados obtidos por FOLEGATTI & ALVES (1987) para o fungo M.anisopliae, o fungo B.bassiana demonstrou ser pouco seletivo aos parasitóides da broca da cana, D.saccharalis, indicando que seu uso nesse ecossistema deve ser cuidadoso.

Tabela 28. Efeito da exposição de adultos de *M.minense* ao fungo *B. bassiana* na dosagem de 10^7 conídios/ml.

Temperatura (°C)	Condições	Nº de adultos expostos	% de mortalidade acumulada após					% de mortalidade confirmada
			1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	
22	T ₁ = tratamento	50	-	-	10,0	82,0	100,0	0
	T ₂ = testemunha	50	-	-	8,0	78,0	100,0	0
26	T ₃ = tratamento	50	2,0	32,0	78,0	100,0		12,0
	T ₄ = testemunha	50	6,0	30,0	92,0	100,0		0
30	T ₅ = tratamento	50	22,0	34,0	96,0	100,0		26,0
	T ₆ = testemunha	50	20,0	36,0	88,0	100,0		4,0

Tabela 29. Efeito da exposição de adultos de *Paratheresia claripalpis* ao fungo *Beauveria bassiana* na dosagem de 10^7 conídios/ml.

Temperatura (°C)	Condição	Nº de adultos expostos	% de mortalidade acumulada após					% de mortalidade confirmada
			1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	
22	T ₁ = tratamento	50	2,0	6,0	18,0	58,0	100	60,0
	T ₂ = testemunha	50	-	4,0	20,0	70,0	100	0
26	T ₃ = tratamento	50	-	30,0	68,0	98,0	100	10,0
	T ₄ = testemunha	50	-	20,0	86,0	98,0	100	0
30	T ₅ = tratamento	50	24,0	42,0	88,0	100		20,0
	T ₆ = testemunha	50	30,0	42,0	78,0	100		0

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na pesquisa podem ser relatadas as seguintes conclusões:

1. A ação do fungo *Beauveria bassiana* associado aos parasitóides da broca da cana-de-açúcar é mais eficiente que a ação do fungo ou dos parasitóides, isoladamente.

2. A idade da larva dos parasitóides entre 1 a 6 dias por ocasião da infecção do hospedeiro com o fungo, não proporciona uma significativa diferença na taxa de sobrevivência do parasitóide.

3. O fungo *Beauveria bassiana* mostra-se patogênico aos adultos dos três parasitóides, *Cotesia flavipes*, *Metagonistylum minense* e *Paratheresia claripalpis*.

4. A utilização do isolado 196 de *Beauveria bassiana* no agroecossistema da cana-de-açúcar deve ser considerada um risco para a sobrevivência dos parasitóides de *Diatraea saccharalis*, estudados, sendo necessários estudos para seleção de isolados altamente patogênicos para a praga e mais seletivos aos inimigos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. Caracterização, padronização e produção de *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, 1986(a) cap. 6, p.73-126.

ALVES, S.B. Epizootiologia. In: ALVES, S.B., coord. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Manole, 1986(b). cap.4, p. 28-61.

ALVES, S.B. & SOSA GÓMEZ, D.R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel., 1908). Poliagro 5(1): 1-9, 1983.

ALVES, S.B.; PÁDUA, L.E.M.; AZEVEDO, E.M.V.de; ALMEIDA, L.C.
Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria*
bassiana. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 20
(4): 403-6, 1985.

ALVES, S.B.; JARAMILLO, C.B.J.; SILVEIRA NETO, S. Patogeni-
cidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado 61 ao
bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman. In: CON-
GRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Rio de Janeiro,
1986. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do
Brasil, 1986. p.186.

ALVES, S.B.; STIMAC, J.L.; CAMARGO, M.T.V. Susceptibility of
Solenopsis invicta Buren and *S.saevisissima* F. Smith to
isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. In: ANNUAL
MEETING OF SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 21., San
Diego, 1988. Programs and abstracts. San Diego, University
of California, 1988. p.35.

AUSTIN, A.D. & DANGERFIELD, P.C. The taxonomy of new world
microgastrine braconids (Hymenoptera) parasitic on *Diatraea*
spp. (Lepidoptera: Pyralidae). Bulletin of Entomological
Research, London, 79, 131-44, 1989.

- BARBOSA, F.R.; MOREIRA, W.A.; CZEPACK, C. *Beauveria bassiana*: promissor agente de controle biológico da cigarrinha-das-pastagens *Deois flavopicta*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1984. p.175.
- BELL, J.V.; KING, E.G.; HAMALLE, R.J. Interactions between bollworms, a braconid parasite, and the bacterium *Serratia marcescens*. Annals of the Entomological Society of America, Lanham, 67(4): 712-4, 1974.
- BERISFORD, Y.C. & TSAO, C.H. Parasitism, Prédation, and Disease in the Bagworm, *Thyridopteryx ephemeraeformis* (Haworth)(Lepidoptera: Psychidae). Environmental Entomology Lanham, 4(4): 549-54, 1975.
- BORGES, V. Estudo de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. 1883 para controle de cigarrinhas das pastagens. Piracicaba, 1985. 99p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP.).
- BROBYN, P.J.; CLARK, S.J.; WILDING, N. The effect of fungus infection of *Metopolophium dirhodum* (Hom.: Aphididae) on the oviposition behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphii* (Hym.: Aphididae). Entomophaga, Paris, 33(3): 333-8, 1988.

- BROOKS, W.M. Protozoa: Host-Parasite-Pathogens Interrelationships. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, Lanham, 9: 105-11, 1973.
- BURLEIGH, J.G. Comparison of *Heliothis* spp. larval parasitism and *Spicaria* infection in closed and open canopy cotton varieties. Environmental Entomology, Lanham, 4: 574-6, 1975.
- CARVALHO, S.M. & SILVA, S.M.T. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Diabrotica speciosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1984. p.137.
- 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, Lanham, 74: 617-21, 1981.
- DIEHL-FLEIG, E. & SILVA, M.E. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* à formiga saúva *Atta sexdens piriventris*. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, Brasília, 6: 15-6, 1986.

DUNBAR, J.P. & JOHNSON, A.W. *Bacillus thuringiensis*: Effects on the survival of a tobacco budworm parasitoid and predator in the laboratory. Environmental Entomology, Lanham, 4(2): 352-4, 1975.

EL-KADI, M.K. & HAMED, A.R. Susceptibility of the cotton-leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lep.: Noctuidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces* sp.. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 7., Brasília, 1983. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1983. p.194.

ELLER, F.J.; BOUCIAS, D.G.; TUMLINSON, J.H. Interactions between *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) and a Nuclear Polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (Lepidoptera : Noctuidae). Environmental Entomology, Lanham, 17(6): 977-82, 1988.

EL-SUFTY, V.R. & FÜHRER, E.. Wechselbeziehungen zwischen *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae), *Apanteles glomeratus* L. (Hym. : Braconidae) und dem Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, Hamburg, 92(4): 321-9, 1981.

- EL-SUFTY, V.R. & FUHRER, E. Wechselbeziehungen zwischen *Cydia pomonella* L.(Lep., Tortricidae), *Ascogaster quadridentatus* Wesm. (Hym., Braconidae) und der Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, Hamburg, 99(5): 504-11, 1985.
- FERNANDES, P.M.; DAoust, R.A.; MAGALHÃES, B.P.; YOKOYAMA, M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* aplicada sobre folhas de caupi (*Vigna unguiculata*) e tubérculos de *Cayaponia* sp. a *Diabrotica speciosa* e *Cerotoma* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1984. p. 174.
- FERNANDES, P.M.; LECUONA, R.E.; ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a broca do café, *Hypotenemus hampei* FERRARI (1867) (Coleo.: Scolytidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Rio de Janeiro, 1986. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1986. p.182.
- FOLEGATTI, M.E.G. & ALVES, S.B. Interação entre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., 1883 e os principais parasitóides da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Itabuna, 16(2): 351-62, 1987.

FOLEGATTI, M.E.G.; ALVES, S.B.; BOTELHO, P.S.M. Patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para pupas e adultos de *Apanteles flavipes* (Cam.). Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 25(2): 247-51, 1990.

HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. Enzootia em larvas de *Brassolis sophorae* causada por *Beauveria bassiana*, com estudos de identificação e sintomatologia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4., Goiania, 1977. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1977. p.115.

HADDAD, M.L. Análise de próbites. In: ALVES, S.B., coord. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Manole, 1986. cap. 21, p.374-83.

HALL, R.A. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. Annals of Applied Biology, Wellesbourne, 101, 1-11, 1982.

HAMES, B.D. & RICKWOOD, D.; ed. Gel eletroforesis of proteins; a practical approach. Oxford, IRL Press, 1981. 250p.

- HAMM, J.J.; NORDLUND, D.A.; MULLINIX Jr., B.G. Interaction of the microsporidium *Vairimorpha* sp. with *Microplitis croceipes* (Cresson) and *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), two parasitoids of *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera : Noctuidae). Environmental Entomology, Lanham, 12: 1547-50, 1983.
- HAMM, J.J.; NORDLUND, D.A.; MARTI, O.G. Effects of a Nonoccluded virus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on the Development of a parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). Environmental Entomology, Lanham, 14(3): 258-61, 1985.
- HANKIN , L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, Bronx, 67: 597-607, 1975.
- HARPER; A.M. & HUANG, H.C. Evaluation of the entomophagous fungus *Verticillium lecanii* (Moniliales: Moniliaceae) as a control agent for insects. Environmental Entomology, Lanham 15(2): 281-4, 1986.
- HASSAN; S. & KRIEG, A. Über die schonende wirkung von *Bacillus thuringiensis* Präparaten auf den Parasiten *Trichogramma cacoeciae* (Hym.: Trichogrammatidae). Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Stuttgart, 82: 515-21, 1975.

HENSLEY; S.D. & HAMMOND, A.M. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. Journal of Economic Entomology, Lanham 74: 617-21, 1981.

IGNOFFO, C.M. Entomopathogens as insecticides. Environmental Letters, New York, 8: 24-40, 1975

JAKES, R.P. The effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the fauna of an apple orchard. The Canadian Entomologist, Ottawa, 97: 795-802, 1965.

JAKES; R.P. & MORRIS, O.N. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. In: BURGESS, H.D. Microbial Control of pests and plant diseases 1970-1980. London, Academic Press, 1981. 695-715.

KAYA; H.K. Toxic factor produced by a granulosis virus in armyworm larva: effect on *Apanteles militaris*. Science, New York, 168: 251-3, 1970.

KAYA, H.K. Interaction between *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) and *Apanteles militaris* (Hymenoptera : Braconidae), a Parasitoid of the Armyworm, *Psudaletia unipuncta* . Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 31: 358-64, 1978.

- KAYA, H.K. & TANADA, Y. Hemolymph factor in armyworm larvae infected with a nuclear polyhedrosis virus toxic to *Apanteles militaris* . Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 21: 211-4, 1973.
- KHACHATOURIANS, G.G. Production and use of biological pest control agents. Trends in Biotechnology, Amsterdam, 4: 120-4, 1986.
- KING, E.G. & BELL, J.V. Interactions between a braconid *Microplitis croceipes* , and a fungus, *Nomuraea rileyi*, in laboratory-reared bollworm larvae. Journal of invertebrate Pathology, Duluth, 31: 337-40, 1978.
- LANDA, Z. Ochrana proti molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum* Westw.) v programech integrované ochrany skleníkových okurek. Sborník UVTIZ. Zahradnictví, 11(3): 215-28, 1984.
- LECUONA, R.E. Controle microbiano de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch e o vírus da granulose e simulação dos efeitos de sua aplicação. Piracicaba, 1986. 170p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP.).

- LEITE, L.G.; FRAGA, A.I.A.; ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Paecilomyces* sp. sobre *Nezara viridula* L. Ecossistema, Espírito Santo do Pinhal, 12: 20-4, 1987.
- LEVIN, D.B.; LAING, J.E.; JACQUES, R.P. Interactions between *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae) and granulosis virus in *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). Environmental Entomology, Lanham, 10(1): 65-8, 1981.
- LOAN, C. Suppression of the fungi *Zoophtora* spp. by captafol: A technique to study interaction between disease and parasitism in the alfafa, weevil *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). Proceedings of the Entomological Societ of Ontario, Ontario, 112: 81-2, 1981.
- LORD, J.C.; MAGALHÃES, B.P.; ROBERTS, D.W. Effects of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. behaviour, oviposition, and suscetibility to secondary infections of adult *Cerotoma arcuata* (Oliver, 1741) (Col.:Chrysomelidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Itabuna, 16 (1): 187-97, 1987.
- LUCCHESI, M.E.P. Desenvolvimento e avaliação de diferentes sistemas de inoculação do fungo entomopatogênico *Beauveria* em colonias de *Atta sexdens piriventris*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1987. v.2, p.527.

MACCOY, C.W. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*.

In: BURGESS, H.D. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London, Academic Press, 1981. p. 499-512.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; ALMEIDA, L.C.; ARAÚJO, J.R.;

MAGRINI, E.A. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar; manual de instrução. Piracicaba, IAA/PLANALSUCAR, 1983. 22p.

Mac LEOD, D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill.

and *Tritirachium* Limber. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 32: 818-93, 1954.

MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; WRIGHT, S.P.; DAOUST, R.A.;

ROBERTS, D.W. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoopthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriophis connexa*. Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 52(3): 471-3, 1988.

MARQUES, E.J.; LIMA, R.O.R.; VILLAS BOAS, A.M.; RIBEIRO, S.M.

A. Potencial de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no controle da broca gigante *Castnia licus* Drury em canaviais de solos arenosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Rio de Janeiro, 1986. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1986. p.216.

- MARTINS, J.F.da S.; MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C. Patogenicidade dos fungos *Beauveria bassianae* *Metarhizium anisopliae* sobre *Tibraca limativentris* percevejo do colmo do arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1987. v.1. p. 188.
- MASON, W.R.M. The polyphyletic nature of Apanteles Foerster (Hymenoptera-Braconidae); a phylogeny and reclassification of Microgastrinae. Ottawa, Entomological Society of Canada, 1981. 147p. (Memoirs of the Entomological Society of Canada, 115).
- MILNER, R.J. Pathogen importation for biological control-risks and benefits. In: GIBBS, A. & MEISEHRE, R., ed. Pests and parasites as migrants. Cambridge, Cambridge University Press, 1986. p.115-21.
- MILNER, R.J.; LUTTON, G.G., BOURNE, J. A Laboratory study of interaction between aphids, fungal pathogens and parasites. In: AUSTRALIAN APPLIED ENTOMOLOGICAL RESEARCH CONFERENCE, 4., Adelaide, 1984. Pest control: recent advances and future prospects; proceedings, edited by P. Bailey and D. Swincer. Canberra, CSIRO, 1984. p.375-81.

MONTEIRO, A.C. Aspectos fisio-ecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região Amazônica (Manaus). São Carlos, 1988. 228p. (Doutorado-Universidade Federal de São Carlos).

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Variabilidade e recombinação genética no deuteromyceto *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. Piracicaba, 1988. 193p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP.).

PARIS, S. & SEGRETAIN, G. Etude de l'activité lipasique estearasique intracellulaire de *Beauveria tenella*. Annales de Microbiologie Institut Pasteur, Paris, 129 (2): 133-45, 1978.

PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii* (*Beauveria tenella*). Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 34: 71-7, 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, Duluth, 34: 238-247, 1979.

PHADKE, C.H. & RAO, V.G. Studies on the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) SAMSON. Current Science, Bangalore, 47(14): 511-2, 1978.

- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D.
& BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*.
Adv. Genet., 5: 141-238, 1953.
- QUINTELA, E.D.; MAGALHÃES, B.P.; ROBERTS, D.W. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* ao *Chalcodemus bimaculatus* (Col.: Curculionidae), praga do caupi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. Resumos. Porto Alegre, Sociedade Entomológica do Brasil, 1987. v.1, p.191.
- RAJAMANI S. & HILDA, A. Plate assay to screen fungi for proteolytic activity. Current Science, Bangalore, 56: 1179-81, Nov. 1987.
- RAMAKERS; P.M.J. *Aschersonia aleyrodis*, a selective biological insecticide. Bulletin SROP, 6(3): 167-71, 1983.
- RAMAKERS, P.M.J. & SAMSON, R.A. *Aschersonia aleyrodis*, a fungal pathogen of whitefly II. Application as a biological insecticide in glasshouses. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, Hamburg, 97(1): 1-8, 1984.
- ROBBS, C.F. Combate biológico por intermédio de microorganismos. Simpósio Brasileiro sobre Combate Biológico. Bol.Inst. Ecol. Exp. Agric. Rio de Janeiro 1: 21, 1962.

ROCKWOOD, L.P. Entomogenous fungi of the genus *Metarhizium* on wireworms in the pacific northwest. Annals of the Entomological Society of America, Columbus, 43(4): 495-8, 1950.

SAMSINAKOVA, A. Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 8: 395-400, 1966.

SAMSON, R.A. Identification of entomopathogenic deuteromycetes. In: BURGESS, H.D. Microbial control of pests and plant disease 1970-1980. London, Academic Press, 1981. p.93-106.

SIEGEL, J.P.; MADDOX, J.V.; RUESINK, W.G. Impact of *Nosema pyrausta* on a braconid, *Macrocentrus grandii*, in Central Illinois. Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 47: 271-6, 1986.

SMITH, J.W.; KING, E.G.; BELL, J.V. Parasites and pathogens among *Heliothis* species in the central Mississippi Delta. Environmental Entomology, Lanham, 5: 224-6, 1976.

SOSA GÓMEZ, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de onze aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. I. Estandartización, virulencia y actividad enzimática. Cirpon Revista de Investigación, Tucuman, 1: 83-102, 1983.

SOSA GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; MACHADO NETO, R. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. III. Inactivación de conídios con luz ultravioleta y zimogramas del sistema de alfa-estearasas. Cirpon Revista de Investigación, Tucuman, 2(112): 47-54, 1984.

SOSA GÓMEZ, D. R.; RICCI, J.G.; NASCA, A.J. Efecto de *Hirsutella thompsonii* FISCHER, var. *thompsonii*, sobre larvas y adultos de *Coccidophilus citricola* BRETHES y *Lindorus lophantae* (BLAISDELL)(Col.; Coccinellidae). CIRPON, Revista de Investigación, Tucuman, 3(1-2): 73-7, 1985.

SOSA GÓMEZ, D.R. Caracterização de isolados de *Beauveria* spp. e determinação das exigências térmicas e hídricas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Piracicaba, 1990. 103p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP.).

TANADA, Y. Epizootiologia de las enfermedades de insetos.

In: DeBACH, P. Controle biológico de las plagas de insetos y malas hierbas. México, Ed. Continental, 1975 . p.647-78.

THOMS, E.M. & WATSON, T.F. Effect of Dipel (Bacillus Thuringiensis) on the Survival of Immature and adult Hyposoter exiguae (Hymenoptera: Ichneumonidae). Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 47: 178-83, 1986.

TIGANO, M. Contribution à l'étude de la variabilité génétique de Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin hyphomycète entomopathogène. Paris, 1985. 175p. (Doctorat de L' Université Paris).

TONET, G.L. & REIS, E.M. Patogenicidade de Beauveria bassiana em insetos pragas de soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 14(1): 89-95, 1979

VAIZER, Y.A.. (On the problem of introducing entomopathogenic microorganisms). Informatsionnyi Byulletin VPS MOBB. 9: 53-4, 1983. Apud. Review of Applied Entomology. ser. A, London, 72(8): 642, Ago. 1984. (Resumo).

VERENINI, M. Development of parasitoids in hosts affected by infectious diseases. Bollettino dell' Instituto di Entomologia della Università degli Studi di Bologna, Bologna, 37: 225-65, 1983.

- VERSOI, P.L. & YENDOL, W.G. Discrimination by the parasite, *Apanteles melanoscelus* between healthy and virus-infected gypsy moth larvae. Environmental Entomology, Lanham, 11 (1): 42-5, 1982.
- VILAS BOAS, A.M. Patogenicidade de *Beauveria* spp. e seu efeito associado ao inseticida monocrotophos sobre *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lep.: Castniidae). Piracicaba, 1986. 114p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP.).
- WESELOH, R.M.; ANDREASIS, T.G.; MOORE, R.E.B.; ANDERSON, J. F. DUBOIS, N.R.; LEWIS, F.B. Field confirmation of a Mechanism Causing Synergism between *Bacillus thuringiensis* and the Gypsy Moth Parasitoid, *Apanteles melanoscelus*. Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 41: 99-103, 1983.
- WOLLAM, J.D. & YENDOL, W. G. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* and a parasitoid for suppression of the Gypsy Moth. Journal Economic Entomology, Lanham, 69(1): 113-8, 1976.