CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria* spp. E DETERMINAÇÃO
DAS EXIGÊNCIAS TÉRMICAS E HÍDRICAS DE
Beauveria bassiana (BALS.) VUILL.

DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO B. ALVES

Tese apresentada a Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas - Área de
Concentração : Entomologia

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

JUNHO - 1990

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria* spp. E DETERMINAÇÃO
DAS EXIGÊNCIAS TÉRMICAS E HÍDRICAS DE
Beauveria bassiana (BALS.) VUILL.

DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ

Aprovada em : 21 de junho, 1990

Comissão julgadora :

Dr. Sérgio Batista Alves

ESALQ/ USP

Dr. João Lucio Azevedo

ESALQ/ USP

Dr. Sinval Silveira Neto

ESALQ/ USP

Dr. Flávio Moscardi

CNPSo/ EMBRAPA

Dr. Jerry Lynn Stimac

Universidade da
Flórida / U.S.A.

Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

A meus Pais e irmãos

A minha esposa Rosélis e meus filhos

Adrián e Daniele.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a este País por tê-lo acolhido com generosidade.

-Ao Dr. Sérgio B. Alves, Professor Associado do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" por sua orientação e apoio durante o decorrer do presente trabalho.

-Ao Dr. Gilberto C. Batista por ter oferecido a oportunidade para concursar a bolsa de estudos.

-Ao governo do Brasil através do Ministério de Relações exteriores, CNPq e CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

-Ao CNPq/EMBRAPA pelo apoio concedido durante a redação da tese e análise dos dados.

-As Dras. Luzia Paccolla Meirelles e Myrian Tigano pela realização das corridas eletroforéticas.

-Aos amigos que ajudaram a superar muitas dificuldades: Enrique Castiglioni Rosales, Francisco Badilla, João Justi Jr., João S. Lopes, Maria Elisabete G. Folegatti, Maria Madalena L. Costa, Maria Teresa V. de Camargo, Miguel Neira, Paulo E. Degrande, Paulo M. Fernandes, Pedro M. O. J. Neves, Renata dos Santos Mendonça, Teresinha A. Giustolin.

-A Solange A. Vieira pela colaboração nos trabalhos de laboratório.

-Ao IAA/PLANALSUCAR de Araras, São Paulo, nas pessoas do Dr. Paulo Sérgio M. Botelho e Marcos Pizzano, pelo fornecimento das lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr.).

-Aos Prof. do Departamento de Entomologia pelos ensinamentos transmitidos.

-A Dra. Maria Cristina de Oliveira pela ajuda nas análises estatísticas.

-A Estação Experimental Obispo Colombres, de Tucumán, Argentina e a Eng.^o Sara L. de Diez do INTA, Oliveros, Argentina por ter fornecido os dados climatológicos para elaboração dos climogramas.

ÍNDICE

Página

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Caracterização.....	3
2.1.1. Atividade enzimica.....	4
2.2. Epizootiologia de fungos entomopatogênicos.....	5
2.2.1. Influência da umidade relativa e temperatura sobre a conidiogênese de fungos entomopatogênicos.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. MATERIAL.....	9
3.1.1. Isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	9
3.1.2. Meios de cultura.....	11
3.1.3. Insetos utilizados.....	14
3.2. MÉTODOS.....	15
3.2.1. Caracterização de isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	15
3.2.1.1. Determinação das dimensões dos conídios...15	
3.2.1.2. Atividade enzimica.....16	
3.2.1.3. Crescimento e conidiogênese "in vitro" de isolados de <i>Beauveria</i> spp.17	
3.2.1.4. Bioensaios.....17	
3.2.1.5. Determinação dos zimogramas do sistema α -estearase.....18	
3.2.1.6. Análise fenética.....19	

3.2.3. Conidiogênese sobre cadáveres de hospedeiros.....	22
3.2.3.1. Curvas de conidiogênese a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	22
3.2.3.2. Conidiogênese em diferentes condições de temperatura e umidade relativa.....	23
3.2.3.2.1. Conidiogênese sobre pentatomídeos.	23
3.2.3.2.2. Conidiogênese sobre lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i>	23
3.2.4. Termohigrogramas.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Caracterização de isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	26
4.1.1. Determinação das dimensões dos conídios dos isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	26
4.1.2. Atividade enzimica dos isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	28
4.1.2.1. Atividade lipolítica.....	28
4.1.2.1.1. Diâmetro das colônias dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. em meio para determinação da atividade lipolítica.....	31
4.1.2.2. Atividade amilolítica.....	32
4.1.2.3. Atividade proteolítica.....	36
4.1.3. Crescimento e conidiogênese "in vitro" dos isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	41
4.1.3.1. Crescimento dos isolados a diferentes temperaturas	41
4.1.3.2. Conidiogênese dos isolados sob diferentes temperaturas.....	45

4.1.4. Bioensaios com os diferentes isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	47
4.1.5. Padrões eletroforéticos dos sistemas de α -esterase dos isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	49
4.1.6. Análise fenética dos isolados de <i>Beauveria</i> spp.....	51
4.2. Conidiogênese de <i>Beauveria bassiana</i> sobre cadáveres de hospedeiros.....	58
4.2.1. Curvas de conidiogênese através do tempo.....	58
4.2.2. Conidiogênese de <i>Beauveria bassiana</i> a diferentes umidades relativas e temperatura....	64
4.2.2.1. Conidiogênese de <i>Beauveria bassiana</i> sobre pentatomídeos.....	64
4.2.2.2. Conidiogênese de <i>Beauveria bassiana</i> sobre lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> .	67
4.3. Termohigrogramas.....	73
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela

Página

1	Isolados de <i>Beauveria</i> spp. com seus respectivos hospedeiros originais e procedência.....	11
2	Sais utilizados para saturar 100 ml de água destilada deionizada e que forneceram as respectivas umidades relativas (%) em um volume de 3.500 cm ³ do dessecador.....	24
3	Dimensões dos conídios de diferentes isolados de <i>Beauveria</i> spp. que desenvolveram em meio BDA.....	27
4	Média dos índices enzimicos e halos lipolíticos, produzidos pelo isolado 619, após diferentes periodos de incubação a $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h, após repicagem do meio mínimo.....	30
5	Diâmetro das colônias (mm) de <i>Beauveria</i> spp. em meio para determinação da atividade lipolítica, após a repicagem de meio mínimo. $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 horas.Colônias da 6 dias de idade.....	31
6	Produção de amilase de <i>Beauveria</i> spp., expressa em índice enzimico, e crescimento em diâmetro das colônias, após repicagem em meio mínimo e meio BDA . $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h .Colônias de 5 e 6 dias de idade.....	33
7	Produção de amilase de <i>Beauveria</i> spp. expressa em diâmetro do halo (mm) após a repicagem em meio mínimo e meio BDA, com seus respectivos diâmetros das colônias . $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h.Colônias de 6 dias de idade.....	35

8	Produção de protease de <i>Beauveria</i> spp., expressa como índice enzimico, após repicagem em meio mínimo Colônias de diferentes idades. $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h.	37
9	Produção de protease de <i>Beauveria</i> spp. provenientes de meio mínimo, expressa como índice enzimico, após diferentes períodos de incubação. Colônias incubadas a $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h.....	38
10	Produção de protease de isolados <i>Beauveria</i> spp. expressada em diâmetro do halo (mm), após repicagem em meio mínimo. Colônias incubadas a $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h.....	39
11	Produção de protease de <i>Beauveria</i> spp., expressa em diâmetro do halo (mm), proveniente de meio mínimo, após diferentes períodos de incubação. Colônias incubadas a $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h.....	40
12	Média dos diâmetros das colônias (mm) de <i>Beauveria</i> spp., em meio BDA, após 6 dias de crescimento a 4 temperaturas diferentes e fotofase de 12 h.....	41
13	Comparações do crescimento do diâmetro (mm) das colônias de <i>Beauveria</i> spp. em geral e a cada temperatura após 6 dias de incubação. Fotofase de 12 horas.....	43
14	Produção de conídios ($n \times 10^6$) por colônia dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. a diferentes temperaturas.....	45

15	Médias gerais e originais da produção de conídios ($n \times 10^6$) nas diferentes temperaturas.....	46
16	Tempos Letais 50 (TL ₅₀) resultantes das inoculações dos isolados de <i>Beauveria</i> spp. em lagartas de 4 ^o instar de <i>Diatraea saccharalis</i> , quando pulverizadas com uma suspensão de $2,7 \times 10^8$ conídios /ml.....	47
17	Matriz básica dos caracteres codificados em duplo estado para cada uma das OTU's em estudo.....	51
18	Autovalores obtidos da análise dos componentes principais em 287 rotações.....	54
19	Autovetores obtidos da análise dos componentes principais..	55
20	Número de conídios ($n \times 10^6$) formados sobre lagartas de 5 ^o instar de <i>D. saccharalis</i> de $(20 \pm 1 \text{ mm})$ a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 90 e 100 % de UR, durante diferentes periodos de tempo....	59
21	Porcentagem média de pentatomídeos que apresentaram esporulação do isolado 618 a 90 % de umidade relativa em diferentes temperaturas, com os respectivos números de conídios.....	64
22	Número de conídios ($n \times 10^6$) dos isolados 499 e 618 formados sobre lagartas de <i>D. saccharalis</i> de 5 ^o instar em diferentes condições de umidade e temperatura após 5 dias de incubação.....	67
23	Efeito das diferentes temperaturas, em cada umidade relativa, sobre o número de conídios ($n \times 10^6$) do isolado 499 formados sobre lagartas de 5 ^o instar de <i>Diatraea saccharalis</i>	70

24	Efeito das diferentes umidades relativas, em cada temperatura, sobre o número de conídios ($n \times 10^6$) do isolado 499 formados sobre lagartas de 5º instar de <i>Diatraea saccharalis</i>	70
25	Efeito das diferentes temperaturas, em cada umidade relativa, sobre o número de conídios do isolado 618 formados sobre lagartas de 5º instar de <i>Diatraea saccharalis</i>	71
26	Efeito das diferentes umidades relativas, em cada temperatura, sobre o número de conídios do isolado 618 formados sobre lagartas de 5º instar de <i>Diatraea saccharalis</i>	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1	a) Precipitado formado pela liberação de lipase, no meio de cultura, pelo isolado 619 de <i>Beauveria brongniartii</i> . b) isolado 353 de <i>B. bassiana</i> sobre o mesmo meio sem formação de precipitado.....
2	Crescimento do isolado 620 de <i>Beauveria bassiana</i> durante 6 dias a $34 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em meio BDA e 12 h de fotofase.....
3	Zimogramas do sistema de α -estearases de diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (isolados 353, 457, 458, 499, 500, 501, 617, 618, 620) e <i>B. brongniartii</i> (isolado 619).....
4	Fenograma representativo das distâncias fenéticas entre isolados de <i>Beauveria</i> spp., por distância euclidiana média e método ponderado de agrupamento aos pares (WPGMA). Grau de encadeamento, $C=0,50$. Coeficiente de Correlação Cofenético, $CCC = 0,89$
5	Análise dos componentes principais do gênero <i>Beauveria</i> spp. Gráfico tridimensional com a projeção das OTU'S nos tres primeiros componentes o que representa 61,4 % da variação total.....
6	Conidiogênese dos isolados 499 e 618 de <i>Beauveria bassiana</i> sobre lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> de 5 ^o instar, de 20 ± 1 mm, a 90 e 100 % de umidade relativa durante 10 dias a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

7	Conidiogênese dos isolados 499 e 618 de <i>Beauveria bassiana</i> sobre lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> de 5º instar e 20 ± 1 mm de comprimento, durante 10 dias (0) valores observados e (+----+) valores teóricos.....	62
8	Formação de sinemios pelo isolado 618 de <i>Beauveria bassiana</i> , em condições de baixa intensidade de iluminação.....	63
9	Conidiogênese dos isolados 499 e 618 de <i>Beauveria bassiana</i> , sobre lagartas de 5º instar de <i>Diatraea saccharalis</i> de 20 ± 1 mm colocadas sob diferentes condições de umidades relativas e temperatura durante 5 dias.....	68
10	Termohigrograma representativo das épocas com maiores possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico <i>Beauveria</i> spp. correspondente a região de Oliveros, Santa Fé , Argentina.....	76
11	Termohigrograma representativo das épocas com maiores possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico <i>Beauveria</i> spp. correspondente a região de Las Talitas, Tucumán, Argentina.....	77
12	Termohigrograma representativo das épocas com maiores possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico <i>Beauveria</i> spp. correspondente a região de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.....	82
13	Termohigrograma representativo das épocas com maiores possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico <i>Beauveria</i> spp. correspondente a região de Londrina, Paraná	83

CARACTERIZAÇÃO DE *Beauveria* SPP. E DETERMINAÇÃO DAS EXIGÊNCIAS
TÉRMICAS E HÍDRICAS DE *Beauveria bassiana*
(BALS.) VUILL.

Autor: DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ

Orientador: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar nove patótipos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e um patótipo de *B. brongniartii* (Sacc.) Petch considerando produção de enzimas extracelulares (amilase, lipase e protease), taxa de crescimento em diferentes meios de cultura, conidiogênese "in vitro", variação de isoenzimas, virulência e dimensões dos conídios. Com estas características foram calculados coeficientes de similaridade mediante os quais foram construídos fenogramas, com a finalidade de estimar a distância fenética entre os patótipos. Os isolados provenientes de uma mesma região tiveram altos coeficientes de similaridade, sugerindo populações geográficas. Mediante ensaios de laboratório foi avaliada a conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres de *Diatraea saccharalis* (F.) mantidos sob umidades relativas de 75, 80, 85, 90 e 100 % associadas com temperaturas de 22, 26, 30 e 34 °C, durante 5 dias. A maior conidiogênese foi obtida a 26 °C e 100 % de UR. Os isolados esporularam na faixa de 80 a 100 % de UR. Na umidade relativa de 75 % a

conidiogênese foi incipiente sobre lagartas de *D. saccharalis* e não ocorreu sobre os percevejos *Nezara viridula* (L.) e *Piezodorus guildinii* (Westwood). Foi determinada a equação da curva logística para a conidiogênese dos isolados 499 e 618 (= ARSEF 933), durante dez dias em condições ótimas. A conidiogênese foi função da umidade relativa e temperatura, patótipo, hospedeiro (qualidade nutricional e superfície) e tempo. A utilização dos climogramas constitui-se em uma metodologia útil para determinar as regiões e épocas com maiores probabilidades de ocorrência destes fungos entomopatogênicos.

CHARACTERIZATION OF *Beauveria* SPP. AND DETERMINATION OF
TEMPERATURE AND HIDRIC REQUIREMENTS OF *Beauveria bassiana*
(BALS.) VUILL.

Author: DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ

Adviser: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY

Based on extracelullar enzyme production (amylase, lipase, and protease), growth rate on different culture media, conidiogenesis "in vitro" , isoenzyme variation, virulence and conidia dimensions, nine pathotypes of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and one pathotype of *B. brongniartii* (Sacc.) Petch were characterized . Pairwise coefficients of similarity calculated from all these parameters were used to construct phenograms in order to estimate the phenetic distance among the various fungal pathotypes. Isolates from the same regions had high coefficients of similarity, suggesting geographical populations. Laboratory assays were conducted to assess the conidiation of *B. bassiana* on cadavers of *Diatraea saccharalis* (F.) maintained under relative humidities of 75, 80, 85, 90 and 100 % associated with temperatures of 22, 26, 30 and 34 °C during 5 days. The highest conidiation was obtained at 26 °C and 100 % R H. The isolates were able to esporulate at 80 - 100 % R H ; at 75 % R H conidiogenesis was incipient on larvae of *D. saccharalis* and did not occur on the southern green stink bug, *Nezara viridula*

(L.), and on the small stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood). The logistic curve of conidiogenesis was determined for isolates 618 (= ARSEF 933) and 499, during 10 days, in optimal conditions. Conidiogenesis was function of relative humidity, temperature, pathotype, host (nutritional quality, surface) and time. Climatograms showed to be usefull to determine the regions and the period with high probabilities of epizootic occurrence.

1. INTRODUÇÃO

Quando se planeja a implantação de programas de controle biológico, uma necessidade básica é a identificação correta das espécies envolvidas no projeto. Assim, considerando os insetos, a identidade e, ainda, o conhecimento do comportamento do biótipo tem importância essencial para se obter sucesso no controle da espécie visada (CALTAGIRONE, 1985). Da mesma maneira, antes do desenvolvimento dos programas de controle microbiano ou estudos epizootiológicos é imprescindível caracterizar e elucidar o comportamento dos patótipos com os quais serão elaborados os estudos. Estes patótipos sofrem mudanças do seu comportamento, pela ação de fatores intrínsecos (genéticos) e ambientais (abióticos e bióticos).

Dentre os fatores abióticos que possuem maior influência sobre as fases de desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos, a temperatura e umidade podem ser consideradas como as principais.

O estudo dos efeitos destes fatores tem especial relevância no caso do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., já que este entomopatógeno tem sido amplamente aplicado no controle de grande número de pragas (BELL E HAMALLE, 1970; BRADY, 1981; RIBA, 1984; ROMBACH et alii, 1986), além de possuir distribuição cosmopolita. Devido a este último aspecto, existe uma grande variação dos patótipos, desta espécie, em relação a seu comportamento e interação ambiente-fungo. Por exemplo, Yevlakhova e Shvetsova (1965), citados por ROBERTS e YENDOL (1971), encontraram que a temperatura ótima para o crescimento de *B. bassiana* era maior para as raças oriundas do sul do que para as oriundas do norte da Rússia. A mesma variação intraespecífica tem sido observada para *B. bassiana* e outros fungos entomopatogênicos, quando considerados outros aspectos do comportamento (ALVES, 1986b).

O conhecimento do comportamento das diferentes raças permitirá obter informações para a seleção daquelas que apresentam melhor desempenho para cada região ou microclima, além de propiciar a determinação, através de modelos matemáticos das épocas favoráveis, ocorrência de enzootias ou epizootias, ou ainda, o momento oportuno para a indução de epizootias.

Assim, a presente pesquisa tem os seguintes objetivos : caracterizar isolados do gênero *Beauveria*; determinar as temperaturas mais apropriadas para o crescimento "in vitro", determinar a temperatura e umidade mais apropriadas para conidiogênese do fungo sobre cadáveres de hospedeiros naturais e elaborar termohigrogramas para diferentes regiões do Brasil e da Argentina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização

Os trabalhos de caracterização de fungos entomopatogênicos permitem estabelecer diferenças entre os patótipos, mediante o conhecimento de suas características comportamentais, o que é decorrente da fisiologia do fungo e de sua interação com o ambiente. ALVES (1986b) menciona como técnicas de caracterização a serologia, eletroforese, cromatografia, especificidade, virulência, características culturais e morfológicas, entre outras. No Brasil, mediante o emprego destas técnicas, já têm sido caracterizados isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (ALVES, 1982; SOSA GÓMEZ et alii, 1984; BORGES, 1985), sendo que para as espécies do gênero *Beauveria* não tem sido comum a utilização deste conjunto de técnicas para sua caracterização.

Embora a literatura registre trabalhos de caracterização com a utilização de sistemas enzimicos (St. LÉGER et alii, 1986; POPRAWSKI et alii, 1988) e a aplicação de análise fenética baseada somente sobre estes sistemas (BOUCIAS et alii, 1982, COSTAMILAN, 1989), o ideal seria a utilização de caracteres não associados entre eles e que, por sua vez, sejam numerosos, como foi realizado por ALVES et alii (1986) e como foi enunciado por CRISCI e ARMENGOL (1983).

2.1.1. Atividade enzimica

Os estudos sobre atividade enzimica, têm sido realizados considerando basicamente dois aspectos, um que tenta relacionar esta atividade com o processo de infecção e patogenicidade (PARIS e SEGRETAINE, 1975, 1978; PARIS e FERRON, 1979; SOSA GÓMEZ e ALVES, 1983; SILVA e MESSIAS, 1986; SAMUELS et alii, 1989) e o outro que busca caracterizar patótipos que apresentam diferenças quanto a este aspecto (ROSATO et alii, 1981; SOSA GÓMEZ e ALVES, 1983; ALVES et alii, 1986; SAMUELS et alii, 1989).

As metodologias para detectar esta atividade têm sido diferentes, assim, poucas vezes os resultados puderam ser comparáveis. De uma maneira geral, as informações obtidas pelos autores não coincidem quanto a importância de uma determinada enzima no processo da patogênese. Alguns autores atribuem maior importância à lipase (PARIS e SEGRETAINE, 1978; SOSA GÓMEZ e ALVES, 1983), outros à amilase (AL-AIDROOS e SEIFERT, 1980 ou a ambas (SILVA e MESSIAS, 1986). Por outro lado, SAMUELS et alii (1989) observaram que isolados de *M. anisopliae* altamente virulentos para *Nilaparvata lugens* (Stal) (Homoptera : Delphacidae)

careciam de atividade amilolítica extracelular, enquanto St. LEGER et alii (1988) determinaram que existe relação entre uma protease (chimoelastase extracelular) e a virulência de *M. anisopliae* para *Manduca sexta* (Johannson), esta protease provoca a lise das proteínas da cutícula permitindo a rápida invasão do hospedeiro.

2.2. Epizootiologia de fungos entomopatogênicos

A dinâmica das doenças de insetos, sua distribuição, intensidade e frequência de ocorrência só tem recebido maior atenção nas últimas décadas (FUXA e TANADA, 1987). Este fato, provavelmente, deve-se ao sucesso de alguns programas de controle microbiano e ao efeito espectacular de alguns patógenos que provocam epizootias, como *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (ALLEN et alii, 1971), *M. anisopliae* (ALVES, 1986a), *B. bassiana* (PEDIGO et alii, 1973), *Entomophthora* (HARPER e CARNER, 1973), dentre outros.

Um fungo entomopatogênico, para ser considerado potencialmente epizootico, depende das seguintes características: a-taxa de crescimento elevada, b-produção de um grande número de unidades infectivas, c-capacidade de sobrevivência destas unidades infectivas no ambiente do seu hospedeiro, d-capacidade de dispersão (pelo vento, água e outros vetores), e-capacidade de aderência ao seu hospedeiro, f-capacidade de vencer as barreiras físico-químicas do tegumento e hemolinfa do hospedeiro e g-capacidade de provocar sua morte rapidamente. Sobre este último aspecto, é importante salientar que um patógeno muito virulento não necessariamente exercerá um controle permanente e eficiente.

Assim, FUXA (1987), citando diversos autores menciona que: "a alta virulência resulta em um melhor controle das populações de insetos a curto prazo . Por outro lado, estudos realizados mediante o emprego de modelos matemáticos têm indicado que nas estratégias de introdução de entomopatógenos e aumento inoculativo a virulência moderada tem proporcionado melhores resultados. Raças medianamente virulentas de *Bacillus popilliae* , por exemplo, têm fornecido um controle mais eficiente a médio e longo prazo que as raças mais virulentas —". O conhecimento profundo dos aspectos mencionados permitirá entender a seqüência de eventos que deflagram as epizootias ou períodos de elevada prevalência das doenças de insetos.

2.2.1. Influência da umidade relativa e temperatura sobre a conidiogênese de fungos entomopatogênicos

O ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos pode ser afetado pela temperatura, umidade, pH, luz e substâncias químicas, existindo grande número de trabalhos sobre estes fatores em relação às diferentes fases de desenvolvimento destes fungos.

Considerando a seqüência de fases na biologia de um deuteromiceto, como *B. bassiana*, podem ser relacionadas as seguintes etapas (sem considerar a fase saprofítica):

1.-conidiogênese, 2.-liberação do conídio do conidióforo, 3.-disseminação ou dispersão, 4.-aderência no tegumento do hospedeiro, 5.-indução da germinação, 6.-emissão e crescimento do tubo germinativo, 7.-penetração, 8.-crescimento e colonização,

9.-extrusão, e 10.-novamente conidiogênese.

Destas etapas, é provavelmente na conidiogênese que a umidade relativa exerce maior influência, podendo ser limitante nesta fase. Porém, esta tem sido uma das fases menos estudadas em relação aos fatores abióticos. O grupo de fungos entomopatogênicos que tem merecido maior atenção quanto a este aspecto tem sido o dos Entomophthorales (HOLDOM, 1984; GLARE et alii, 1986; MILLSTEIN et alii, 1983). Para Deuteromycetes, Moniliales, os estudos têm sido realizados, predominantemente, quanto ao efeito da umidade e temperatura nos processos de infecção (DUNN e MECHALAS, 1963; FARGUES, 1972; MOORE, 1970; BARSON, 1977; FERRON, 1977; DOBERSKI, 1981; RIBA e MARCANDIER, 1984) e de viabilidade e crescimento (SCHAERFFENBERG, 1964; WALSTAD et alii, 1970; IGNOFFO et alii, 1976; LING e DONALDSON, 1981; ALVES et alii, 1984; RIBA e MARCANDIER, 1984; FERNANDES, 1986), sendo poucos os trabalhos relacionados à conidiogênese com e sem quantificação dos conídios produzidos, podendo-se citar os de RAMOSKA (1984), TEIXEIRA ALVES (1986) e FERNANDES (1986). GETZIN (1961) mencionou que os esporos de *N. rileyi* não se desenvolveram sobre os cadáveres de *Trichoplusia ni* (Hübner) devido à queda da umidade relativa para 80 % ou menos; por outro lado, KISH e ALLEN (1978) mencionaram que ao nível de 70 % de umidade relativa esse mesmo patógeno esporulou parcialmente, sem especificar o número de conídios produzidos.

A determinação das necessidades térmicas e hídricas, além de permitir delimitar as regiões com maiores probabilidades de ocorrência de epizootias (TEIXEIRA ALVES, 1986), fornece

subsídios para a elaboração de modelos de epizootiologia de fungos em insetos (FUXA e TANADA, 1987). Mais especificamente, a quantificação de inóculo produzido sob determinadas condições de umidade e temperatura permite inferir sobre o potencial de disseminação e o potencial de inóculo dentro do ecossistema que se analisa (KISH e ALLEN, 1978), sendo também essencial para se conhecer as condições que favorecem a manifestação das doenças nas populações de insetos, sejam estas naturais ou induzidas (manipulação do ambiente e controle microbiano).

Em relação à quantificação de inóculo, ALVES et alii (1982) estimaram a quantidade de conídios de *M. anisopliae* produzido em um hectare de cana-de-açúcar, em um período de elevada prevalência da doença sobre cigarrinhas. Os autores mencionaram que podem ser obtidos $5,96 \times 10^{13}$ conídios por hectare, o que explicaria a elevada taxa de mortalidade nessa época.

Embora existam estudos sobre o comportamento de alguns fungos entomopatogênicos como *M. rileyi*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* (IGNOFFO, 1981; FERRON, 1981 e ALVES, 1986b) ainda se conhece pouco sobre as causas determinantes das epizootias pois as interações patógeno-hospedeiro-ambiente são muito complexas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O estudo foi realizado no setor de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo. Efetuou-se, quando necessário, a coleta de insetos em outras regiões.

3.1.1.- Isolados de *Beauveria* spp.

Para os ensaios foram utilizados isolados do gênero *Beauveria* provenientes de diversos hospedeiros e regiões do Brasil e do norte da Argentina (Tabela 1). Os mesmos encontram-se depositados no banco de entomopatógenos do setor de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP.

Previamente à conservação dos isolados, foi feita a inoculação em pentatomídeos (*Piezodorus guildinii* (Westwood), *Nezara viridula*

(L.) ou *Diatraea saccharalis* (F.). e reisolados. Os conídios dos fungos purificados entre primeira e terceira repicagem foram suspensos em leite desnatado (10 %). Esta suspensão de conídios foi adsorvida em sílica gel e conservada a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1. Isolados de *Beauveria* spp. com seus respectivos hospedeiros originais e procedência.

Denominação	Data	Hospedeiro original	Procedência	Coletor
ESALQ 353	15-3-85	Pentatomidae	Piracicaba, SP	R. Teixeira Alves
ESALQ 457	11-7-86	<i>Euschistus heros</i>	EMGOPA	R. Gonçalves Ferreira
ESALQ 458	11-7-86	<i>Piezodorus</i> sp.	EMGOPA	R. Gonçalves Ferreira
ESALQ 499*	28-3-86	<i>Diabrotica speciosa</i>	Blanco Pozo, Tucuman, Arg.	D. R. Sosa Gómez
ESALQ 500	6-86	<i>Nezara viridula</i>	Yerba Buena, Tucuman, Arg.	D. R. Sosa Gómez
ESALQ 501*	8-4-86	<i>Maecolaspis monrosi</i>	La Virginia, Tucuman, Arg.	D. R. Sosa Gómez
ESALQ 617 (ARSEF 737)	20-1-82	Pentatomidae	Estrada Goiânia Nerópolis Km 12, GO	Evane Ferreira
ESALQ 618 (ARSEF 933)	20-12-82	<i>Tibraca limbativentris</i>	Estrada Goiânia Nerópolis Km 12, GO	Evane Ferreira
ESALQ 619 (ARSEF 944)	16-3-83	Pentatomidae	Ponta Porã, MS	R. Daoust B. P. Magalhães
ESALQ 620 (ARSEF 1474)	2-4-84	<i>Nezara viridula</i>	Chapecó, SC	B. P. Magalhães R. Daoust e Pinot

*Isolados durante o período de alta prevalência da doença, provavelmente na fase epizootica.

3.1.2. Meios de cultura

A) Meio para determinação da atividade lipolítica CHANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Tween 20 _____ 10 ml

Neopeptona_____10 g
 Cloreto de sódio_____ 5 g
 Cloreto de cálcio dihidratado___0,1 g
 Agar_____ 20,0 g
 Água destilada q.s.p._____ 1000 ml
 pH 6,0

O Tween 20 foi esterilizado separadamente, autoclavado durante 15 minutos a 15 libras de pressão e adicionado 1 ml para 100 ml do meio basal estéril, esfriado aproximadamente a 45 °C.

B)Meio para determinar atividade amilolítica (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Agar nutriente Difco_____ 23 g
 Amido_____ 2 g
 Água destilada q.s.p._____ 1000 ml
 pH 6,4

C)Meio para determinar a atividade proteolítica (GABRIEL, 1968)

Agar nutriente Difco_____ 23 g
 Leite em po desnatado_____ 23 g
 Água destilada q.s.p._____ 1000 ml
 pH 6,0

D)Meio BDA com antibiótico

Agar_____ 20,00 g
 Batata sem casca_____ 200,00 g
 Dextrose_____ 15,00 g
 Sulfato de estreptomicina_____ 0,25 g

Sulfato de dihidroestreptomicina__ 0,25 g

Água destilada q.s.p. _____ 1000 ml

E) Meio para esporulação¹

Fosfato ácido de potássio_____ 0,18 g

Fosfato ácido de sódio heptahidratado_____ 0,52 g

Sulfato de magnéssio heptahidratado _____ 0,30 g

Cloreto de potássio_____ 0,5 g

Glucose _____ 5,0 g

Nitrato de sódio_____ 0,79 g

Extrato de levedura_____ 2,50 g

Agar _____ 10,00 g

Água q.s.p. _____ 500 ml

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

Nitrato de sódio_____ 6,0 g

Cloreto de potássio_____ 0,52 g

Sulfato de Magnéssio heptahidratado_____ 0,52 g

Sulfato ferroso heptahidratado_____ 0.01 g

Fosfato ácido de potássio_____ 3,80 g

Sulfato de zinco heptahidratado_____ 0,001 g

Glucose _____ 1,00 g

Agar Difco_____ 15,00 g

Água q.s.p. _____ 1000 ml

G) Meio SDA + Y

Neopeptona_____ 10,00 g

¹

FOLEGATTI, E.G. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba) Comunicação pessoal, 1987.

Dextrosa _____	40,00 g
Extrato de levedura _____	3,00 g
Água q.s.p. _____	1000 ml

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

3.1.2. Insetos utilizados

Para a realização dos bioensaios utilizaram-se:

-Lagartas de *D. saccharalis* de 4° e 5° instar, fornecidas pelo laboratório de Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR, de Araras, Estado de São Paulo, criadas em dieta artificial HENSLEY e HAMMOND (1968) modificada pelo IAA/PLANALSUCAR (MENDES et alii, 1980)

-Ninfas e adultos de *N. viridula* e *P. guildinii*, coletados na região de Campinas e Piracicaba, Estado de São Paulo, e Londrina (Fazenda Warta, CNPSo/EMBRAPA) do estado de Paraná.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Caracterização dos isolados de *Beauveria* spp.

Antes da realização dos estudos das necessidades térmicas e de umidade para a conidiogênese e crescimento dos isolados foi realizada a caracterização dos mesmos, mediante algumas das técnicas propostas por ALVES (1982) e SOSA GÓMEZ et alii (1984).

3.2.1.1. Determinação das dimensões dos conídios

As dimensões dos conídios dos diferentes isolados foram determinadas usando uma ocular micrométrica com tambor, no aumento de 1000 vezes, sob objetiva de imersão. As lâminas foram montadas com glicerina, sendo mensurados o comprimento e a largura de 50 conídios obtidos de colônias em meio BDA.

3.2.1.2. Atividade enzimica

Para a determinação da atividade lipolítica (item 3.1.2.A), amilolítica (item 3.1.2.B) e proteolítica (item 3.1.2.C), foram utilizados meios de cultura sólidos. Os isolados foram inoculados em três pontos por placa e incubados a $26 \pm 0,5$ °C durante 6 dias. Antes da realização dos ensaios de atividade enzimica, os isolados cresceram em meio mínimo e meio BDA. As atividades lipolíticas e proteolíticas foram avaliadas periodicamente nas mesmas colônias.

Para as leituras dos resultados das atividades enzimicas, utilizaram-se os seguintes métodos:

a) atividade lipolítica

Foi usado como substrato lipídico TWEEN 20 (sorbitanmonolaurato). A presença de enzimas lipolíticas foi determinada mediante a formação de cristais dos sais de cálcio do ácido láurico liberado pela enzima.

b) atividade amilolítica

O halo de degradação do amido foi determinado mediante a adição de lugol 4%, o qual não reage na sua ausência, deixando um halo clarificado.

c) atividade proteolítica

Foi medido o halo de clarificação do meio na periferia da colônia.

3.2.1.3. Crescimento e conidiogênese "in vitro" de isolados de *Beauveria* spp.

Para determinar o crescimento e esporulação "in vitro" dos isolados nas diferentes temperaturas, foram colocados 20 ml de meio de cultura BDA em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após 24h, cada isolado foi inoculado em duas placas de Petri, em 3 pontos por placa, perfazendo assim, 6 repetições por isolado. Em seguida, as placas foram colocadas em câmaras do tipo BOD, marca Fanem, reguladas a $22 \pm 0,5$ °C; $26 \pm 0,5$ °C; $30 \pm 0,5$ °C, $34 \pm 0,5$ °C e equipadas com duas lâmpadas fluorescentes marca Philips (TLD 15w/75 extra luz do dia C L6).

Após 6 dias da inoculação, foi determinado o diâmetro das colônias o qual foi utilizado como índice de crescimento da colônia. As colônias foram cortadas na sua periferia e os conídios produzidos foram suspensos em água destilada estéril mais Tween 20 a 0,01 %, para posterior contagem em câmara de Neubauer, segundo MORAES e ALVES (1986).

Os dados de produção de conídios foram transformados em $\sqrt{n} \times 10^6$. Adotou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado, sendo os dados analisados como um experimento fatorial.

3.2.1.4. Bioensaios

Os bioensaios foram realizados com conídios dos isolados produzidos em meio para esporulação (item 3.1.2.E) após 9 dias de

incubação a $26 \pm 0,5$ °C e 12 h de fotofase. A massa de conídios e micélio foi colhida mediante um bastão de borracha estéril e transferida para água deionizada estéril com Tween 20 (2 gotas em 1.000 ml). Após ter sido realizada a suspensão em agitador de tubos, a mesma foi filtrada e a concentração de conídios ajustada para se obter $2,7 \times 10^8$ conídios / ml.

A inoculação das lagartas de 4^o instar de *D. saccharalis* foi realizada mediante pulverização de 1 ml da suspensão sobre grupos de 20 indivíduos colocados em uma placa de vidro de 15 cm de diâmetro. Foram utilizadas 50 lagartas por isolado, com 10 lagartas por repetição, mantidas sobre colmos tenros de cana-de-açúcar.

A mortalidade diária foi avaliada, sendo corrigida com a mortalidade na testemunha e acumulada diariamente. A mortalidade na testemunha não foi superior a 5 %. Os dados utilizados foram resultantes de dois bioensaios com resultados coincidentes. A causa de mortalidade foi determinada colocando os indivíduos mortos em câmara úmida, para permitir o crescimento e esporulação do fungo. Os dados foram analisados mediante transformação em probites, sendo a estimação dos parâmetros realizada pelo método de likelihood (HADDAD, 1986).

3.2.1.5. Determinação dos zimogramas de α -estearase

Os isolados purificados foram inoculados em meio SDA + Y (item 3.1.2. G) líquido e incubados a 25 °C sob agitação, para obter crescimento micelial durante 7 dias.

A massa micelial foi recolhida mediante lavagens e centrifugações sucessivas, sendo o micélio obtido seco em papel de filtro e pesado. Para a obtenção das proteínas intracelulares, o micélio foi triturado na presença de N líquido., adicionando-se o material obtido ao tampão tris-H Cl 0,04 M, pH = 6,8 (aproximadamente 3 g de micélio para 1 ml de tampão). Esta suspensão foi centrifugada a 16.000 rpm durante 40 min a 4 °C e o sobrenadante, contendo os extratos de proteínas foi 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 descontinuo de tampão (HAMES, 1981). Para a coloração das α -estearase, foi utilizado α - naftil acetato, fast blue RR, utilizando-se como tampão tris H Cl, 0,5 M, pH = 7,1.

3.2.1.6. Análise fenética

A análise fenética foi realizada mediante a utilização de 19 caracteres, detalhados a seguir:

1-Comprimento de conídios: valores menores que 2,12 μ m (= 0) e maiores (= 1).

2-Isolados com produção de lipase extracelular (= 1) e sem produção (= 0).

3-Crescimento aos 5 dias sobre meio para detecção de lipase: diâmetros da colônia menores que 21,60 mm (= 0) e maiores (= 1).

- 4- Índice amilolítico aos 6 dias, após transferência do meio mínimo: valores menores que 1,001 (= 0) e maiores (= 1).
- 5- Índice amilolítico aos 6 dias, após transferência de meio BDA: valores menores que 1,11 (= 0) e maiores (= 1).
- 6-Diâmetro do halo amilolítico aos 6 dias, após a transferência de meio mínimo: valores menores que 11,78 mm (= 0) e maiores (= 1).
- 7-Diâmetro do halo amilolítico aos 6 dias , após a transferência de meio BDA :valores menores que 16,97 mm (= 0) e maiores (= 1).
- 8- Índice amilolítico aos 5 dias, após da transfêrencia de meio BDA: menor que 1,468 (= 0) o maior (= 1).
- 9-Diâmetro da colônia aos 5 dias sobre meio para detecção de amilase, após a transferência de meio BDA: valores menores que 22,41 mm (= 0) e maiores (= 1).
- 10-Diâmetro da colônia aos 6 dias sobre meio para detecção de amilase, após a transferência de meio mínimo: valores menores que 11,63 mm (= 0) e maiores (= 1).
- 11-Diâmetro da colônia aos 6 dias sobre meio para detecção de amilase, após transferência de meio BDA: valores menores que 15,81 mm (= 0) e valores maiores (= 1).
- 12-Índice proteolítico aos 6 dias, após transferência de meio mínimo: valores menores que 1,33 (= 0) e maiores (= 1).

13-Índice proteolítico , média geral, após transferência de meio mínimo: valores menores que 1,23 (= 0) e maiores (= 1).

14-Diâmetro de degradação de protease , média geral, após transferência de meio mínimo: valores menores que 22,62 mm (= 0) e maiores (= 1).

15- Zimogramas: com mais de uma banda intensa (= 1), com no máximo 1 banda intensa (= 0).

16- Crescimento geral "in vitro": média geral de crescimento à 3 temperaturas: valores menores que 18,15 mm (= 0) e maiores (= 1).

17-Conidiogênese geral "in vitro": média geral do número de conídios formados a 3 temperaturas: valores menores que $113,693 \times 10^6$ conídios por colônia (= 0) e maiores (= 1).

18- TL₅₀ : valores menores que 9,17 dias (= 0) e maiores (= 1).

19-Valor da tangente do ângulo da reta de mortalidade vs. tempo: valores de b menores que 3,5956 (= 0) e maiores (= 1).

Os padrões eletroforéticos foram analisados para determinar visualmente suas semelhanças relativas considerando o número, posição e intensidade das isoenzimas de α -esterase, para cada isolado. Foram aplicadas as técnicas de agrupamento de taxonomia numérica e a análise de ordenação dos componentes principais, de acordo com CRISCI e ARMENGOL (1983) e ALVES et alii (1986). Para a elaboração dos fenogramas, foi utilizado o programa SAEG da Universidade Federal de Viçosa.

3.2.3. Conidiogênese sobre cadáveres de hospedeiros

Para os experimentos sobre conidiogênese, utilizaram-se os isolados que provocaram maior mortalidade em menos tempo, com a finalidade de se obter maior número de lagartas infectadas pelo fungo ao mesmo tempo. Embora o isolado 619 tenha apresentado maior virulência, sua utilização não foi possível devido ao fato deste não formar grande número de conídios sobre os hospedeiros.

3.2.3.1. Curva de conidiogênese a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

Para a determinação do número de conídios formados a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e diferentes umidades relativas, lagartas do 5^o instar foram inoculadas com os isolados 499 e 618 mediante imersão das lagartas em uma suspensão contendo 3×10^7 conídios por ml, segundo metodologia de SOSA GÓMEZ e ALVES (1983). No mesmo dia de sua morte, foram selecionadas para as avaliações, lagartas de 20 ± 1 mm de comprimento com coloração levemente rosada e que, por sua vez não apresentavam extrusão do patógeno. As avaliações do número de conídios foram feitas em intervalos de 12 h nas primeiras 24 h e posteriormente, a cada 24 h até o 10^o dia. As equações das curvas foram calculadas mediante o sistema de análise estatística S. A. S. (Statistical Analysis System).

3.2.3.2. Conidiogênese em diferentes condições de temperatura e umidade relativa

3.2.3.2.1. Conidiogênese sobre pentatomídeos

Para se determinar a conidiogênese, foram utilizados 4 dessecadores para cada temperatura. Grupos de 4 dessecadores foram colocados em câmaras BOD reguladas para se obter temperaturas de 22, 26, 30 e 34 °C. Os níveis de umidade relativa dentro dos dessecadores foram calibrados com soluções de ácido sulfúrico para se obter 30, 50, 70 e 90 % de UR, conforme TEIXEIRA ALVES (1986). Para se avaliar a conidiogênese sobre os pentatomídeos, foram utilizados 6 indivíduos de *P. guildinii* e 20 de *N. viridula*, para cada combinação de temperatura e umidade relativa.

3.2.3.2.2. Conidiogênese sobre lagartas de *D. saccharalis*

Devido às variações observadas nos níveis de umidade quando utilizadas soluções de ácido sulfúrico, optou-se pela utilização de soluções saturadas com os sais que constam na Tabela 2. Estas variações da umidade das soluções de ácido sulfúrico também foram observadas por WINSTON e BATES (1960).

As lagartas de *D. saccharalis* foram inoculados da mesma maneira mencionada no item 3.2.3.1., sendo que, depois, 4 insetos foram colocados para cada combinação de temperatura e umidade relativa, perfazendo assim, 4 repetições. A avaliação do número de conídios produzidos foi feita após 5 dias.

Tabela 2. Sais utilizados para saturar 100 ml de água destilada deionizada e que forneceram as respectivas umidades relativas (%) em um volume de 3.500 cm³ do dessecador.

Sais	temperaturas			
	22°C	26°C	30°C	34°C
	umidades relativas (%)			
Na H PO ₄ . 7H ₂ O	90,7 (89,5-91,5) ⁽¹⁾	90,0 (88,5-91,5)	86,6 (85,0-88,0)	85,7 (83,0-88,5)
Mg SO ₄	85,2 (83,5-87,0)	83,4 (82,5-85,0)	78,7 (77,5-80,0)	79,1 (78,0-81,5)
Ba Cl	82,7 (82,0-83,5)	79,5 (77,5-83,0)	80,5 (80,0-81,0)	79,0 (78,0-80,0)
K Cl	83,7 (79,0-85,0)	77,0 (76,0-78,5)	72,8 (72,5-73,5)	72,0 (71,0-73,5)
Sacarose	76,3 (74,5-78,5)	74,5 (72,0-79,5)	71,7 (70,0-73,5)	-

⁽¹⁾ Os valores entre parênteses indicam as umidades relativas mínimas e máximas observadas.

3.2.4. Termohigrogramas

Os dados mensais das temperaturas médias e umidade relativa

média de diferentes regiões do Brasil e da Argentina foram utilizados para a construção de termohigrogramas (SILVEIRA NETO et alii, 1976).

Os dados para as diferentes regiões de Brasil e Londrina foram extraídos de TEIXEIRA ALVES (1986) e IAPAR (1982) respectivamente, os da Argentina foram fornecidos pela Estação Experimental Obispo Colombres de San Miguel de Tucumán (médias de 10 anos) e os de Oliveros, Santa Fé, pela Eng. Sara L. de Diez da Estação Experimental do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA), (valores médios de 27 anos).

Para determinar os valores limites de temperatura e umidade relativa da zona favorável dos termohigrogramas foram considerados os valores observados nos ensaios de laboratório, dados da bibliografia e observações de campo de diversos autores.

Assim, considerou-se como limite inferior para umidade relativa o nível de 75 % (Fig. 9 e Tabela 22), uma vez que nesse nível houve início de esporulação e também devido ao fato que as observações de abrigos meteorológicos geralmente subestimam as condições de umidade relativa no microhabitat deste fungo entomopatogênico. Os valores de temperatura máximos de 30 °C (item 4.1.3.2) e mínimo de 17 °C foram considerados limitantes, uma vez que houve menor esporulação com estas temperaturas (FERNANDES et alii 1989)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos isolados de *Beauveria* spp.

A seguir são relacionados os resultados obtidos nos ensaios e os parâmetros utilizados na caracterização dos isolados de *Beauveria* spp.

4.1.1. Determinação das dimensões dos conídios dos isolados de *Beauveria* spp.

O comprimento dos conídios dos isolados com seus respectivos parâmetros estatísticos constam na tabela 3.

Tabela 3. Dimensões dos conídios de diferentes isolados de *Beauveria* spp. que desenvolveram em meio BDA.

Isolados	Comprimento médio (µm)	Int.Conf. 95 %	Comprimento mínimo máximo	C.V. (%)	Largura média	Int.Conf. 95 %	Largura mínima máxima	C.V. (%)
619	2,81 a	2,62 - 3,00	1,42 5,97	24,15	1,83	1,73 - 1,93	1,23 1,94	18,98
499	2,24 b	2,13 - 2,36	1,52 3,22	18,21	1,75	1,58 - 1,92	1,52 1,95	16,90
458	2,24 b	2,14 - 2,34	1,61 2,84	15,63	1,56	1,40 - 1,65	1,10 2,29	21,03
457	2,20 b	2,11 - 2,29	1,66 3,41	14,34	1,55	1,46 - 1,63	1,04 2,23	20,00
501	2,10 bcd	2,01 - 2,20	1,18 2,94	15,77	1,59	1,44 - 1,73	0,99 2,42	19,44
618	2,05 cd	1,98 - 2,11	1,52 2,61	11,43	1,39	1,29 - 1,50	1,04 1,71	13,07
617	1,93 de	1,84 - 2,01	0,95 2,61	15,74	1,43	1,36 - 1,51	0,85 1,99	17,87
500	1,88 e	1,78 - 1,96	1,33 2,84	18,05	1,56	1,48 - 1,63	0,95 2,18	16,78
353	1,88 e	1,81 - 1,94	1,52 2,51	11,36	1,46	1,39 - 1,52	1,04 1,99	15,83
620	1,87 e	1,80 - 1,94	1,42 2,65	13,83	1,55	1,45 - 1,65	1,14 2,37	17,87

Considerando os valores mensurados, o único isolado que apresentou dimensões não coincidentes com os valores citados para *B. bassiana* na literatura (MAC LEOD, 1954; PETCH, 1931 e DE HOOG, 1972) foi o isolado 619 cujas dimensões correspondem a *B. brongniartii* (MAC LEOD, 1954; DE HOOG, 1972), embora este seja citado por MARTINS et alii (1986) e HUMBER e SOPER (1986) como isolado de *B. bassiana*, sob as denominações CP - 85 e ARSEF 944 respectivamente.

4.1.2. Atividade enzimica dos isolados de *Beauveria* spp.

Para a análise da atividade enzimica foi utilizado o índice enzimico por expressar melhor esta atividade que a área enzimica. Os índices enzimicos utilizados correspondem ao diâmetro do halo de reação dividido pelo diâmetro da colônia.

Embora o índice enzimico seja muito usado por diversos autores (ROSATO et alii, 1981; SOSA GÓMEZ e ALVES, 1983; PACCOLA MEIRELLES, 1988), este pode não representar corretamente a quantidade de enzima produzida, já que fungos com taxas de crescimento diferentes podem apresentar índices enzimicos semelhantes. Por esta razão, também foi considerado nas análises o diâmetro do halo de degradação do substrato, que já tem sido utilizado neste tipo de estudos (RAJAMANI e HILDA, 1987), e que representa a quantidade ou difusibilidade da enzima, independentemente do crescimento da colônia.

4.1.2.1. Atividade lipolítica

Dentre os isolados testados, o único que apresentou atividade lipolítica extracelular foi o 619 (Tabela 4 e Figura 1).

CA)

CB)

Fig.1.a) Precipitado formado pela liberação de lipase, no meio de cultura, pelo isolado 619 de *Beauveria brongniartii*. b) isolado 353 de *B. bassiana* sobre o mesmo meio, sem formação de precipitado.

Tabela 4. Média dos índices enzimáticos e halos lipolíticos, produzidos pelo isolado 619, após diferentes períodos de incubação a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, fotofase de 12 h, após repicagem do meio mínimo.

Dias	índice lipolítico ⁽¹⁾		diâmetro do halo ⁽²⁾ (mm)	
-----	-----		-----	
4	1,45	b	16,17	bc
5	1,48	ab	21,89	ab
6	1,65	a	28,05	a
7	1,16	c	24,89	a
8	0,38	*	8,78	c

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. ⁽¹⁾C.V. = 9,78 % ⁽²⁾C.V. = 31,43 %

* não foi incluído na análise porque o halo de lipase se dissolveu.

Considerando o índice enzimático, a maior atividade lipolítica ocorreu no 5^o e no 6^o dia, sendo que após este período o índice diminuiu em função do crescimento em diâmetro da colônia e da dissolução dos cristais. Assim, no 7^o dia a média do diâmetro do halo de cristais foi menor que no 6^o dia e por outro lado no 8^o dia o halo de cristais foi menor que o diâmetro da colônia (Tabela 4). Se for considerado que existe uma relação linear entre o logaritmo da concentração da enzima e o diâmetro do halo (SAMAD et alii, 1989), a maior produção de lipase ocorreu entre o 5^o e o 6^o dia.

4.1.2.1.1. Diâmetro das colônias dos isolados de *Beauveria* spp. em meio para determinação da atividade lipolítica.

Os dados de crescimento das colônias em meio de HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975) encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Diâmetro das colônias (mm) de *Beauveria* spp. em meio para determinação da atividade lipolítica, após repicagem de meio mínimo. $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 horas. Colônias de 6 dias de idade.

Isolado	diâmetro	
500	25,22	a
499	23,83	ab
620	23,33	b
353	23,22	b
617	22,55	bc
501	22,39	bc
618	21,55	cd
458	20,22	de
457	19,39	e
619	14,33	f

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 4,58 %

Os isolados 499 e 500 de *B. bassiana* foram os que apresentaram maior crescimento radial . Esses isolados foram coletados em Tucumán, Argentina, sobre *D. speciosa* e *N. viridula* respectivamente. Por outro lado, o isolado de *B. brongniartii*, obtido no Mato Grosso do Sul de Pentatomidae, foi o que apresentou o menor crescimento no meio testado. Embora os demais isolados apresentarem crescimento radial intermediário, em relação aos isolados citados, observa-se que o 457 e o 458 apresentaram o mesmo crescimento, e diferiram da maioria dos demais isolados, sendo a única exceção o 618, que não diferiu do 458. Todos esses isolados são de *B. bassiana*.

4.1.2.2. Atividade amilolítica

A atividade amilolítica dos isolados de *Beauveria* spp. encontra-se representada nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Produção de amilase de *Beauveria* spp., expressa em índice enzimático, e crescimento em diâmetro das colônias, após a repicagem em meio mínimo e meio BDA. $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h. Colônias de 5 e 6 dias de idade.

provenientes de meio mínimo		provenientes de meio BDA					
(1)		(2)		(3)		(4)	
Isol.	Índice	Isol.	Índice	Isol.	Índice	Crescimento	
	<u>amilol.</u>		<u>amilol.</u>		<u>amilol.</u>	<u>(mm)</u>	
620	1,33 a	457	1,41 a	457	1,82 a	8,17	f
458	1,27 a	458	1,36 a	618	1,77 ab	19,83	ef
457	1,17 ab	501	1,30 a	458	1,67 b	20,25	e
501	1,11 bc	620	1,26 ab	353	1,48 c	24,67	b
499	1,08 bc	618	1,18 b	620	1,47 c	23,92	bc
619	1,03 bc	499	1,16 b	499	1,46 c	21,42	de
501	1,02 bc	501	1,15 bc	501	1,45 c	27,00	a
353	1,00 c	619	1,14 c	501	1,44 c	23,83	bc
618	1,00 c	353	1,03 c	619	1,17 d	22,67	bc
617	0,00 d	617	0,09 d	617	0,95 e	22,33	cd

Os valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Aos 6 dias : ⁽¹⁾C.V. = 8,37 %

⁽²⁾C.V. = 7,88 % . Aos 5 dias: ⁽³⁾C.V. = 3,78 % ⁽⁴⁾C.V. = 4,71 %

Foi utilizado o índice enzimático em lugar da área enzimática, proposta por LECUONA (1986), porque existem isolados como o 353 e o 618 que degradam o amido presente sob a colônia (Tabela 6) e,

neste caso, a área enzimica seria zero e a produção de amilase seria subestimada. No caso do isolado 617, não houve degradação do amido sob a colônia e, mesmo assim, o índice enzimico foi zero. Portanto, esta característica não pode ser expressa pela área enzimica.

O isolado 617 não apresentou produção de amilase quando repicado em meio mínimo, apresentando, também, atividade amilolítica muito reduzida em meio BDA, quando comparado aos outros isolados (Tabelas 6 e 7). Os isolados 457 e 458 foram os que apresentaram maior índice enzimico, independentemente da transferência prévia para meio mínimo ou meio BDA, embora os isolados 620, 618 e 500 também tenham apresentado boa produção enzimica (Tabela 6). Por outro lado, verificou-se a influência do meio de cultura na produção de enzimas pelos isolados. Quando provenientes de meio mínimo, a produção de enzima foi menor, indicando um efeito conspícuo do componente nutricional na expressão deste caráter (Tabelas 6 e 7). Se for analisado apenas o diâmetro do halo, a maior produção ocorreu para os isolados 619, 500, 353, 499, 458, 620 e 457, os quais diferiram dos isolados 618, 617 e 501 quando as colônias eram provenientes de meio mínimo.

Tabela 7. Produção de amilase de *Beauveria* spp. expressa em diâmetro do halo (mm), após a repicagem em meio mínimo e meio BDA, com seus respectivos diâmetros das colônias. $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12h. Colônias de 6 dias de idade.

proveniente de meio mínimo				proveniente de meio BDA			
diâmetro		diâmetro		diâmetro		diâmetro	
isol. halo ⁽¹⁾	isol. colônia ⁽²⁾	isol. halo ⁽³⁾	isol. colônia ⁽⁴⁾	isol. halo ⁽³⁾	isol. colônia ⁽⁴⁾	isol. halo ⁽³⁾	isol. colônia ⁽⁴⁾
619 16,0 a	619 15,5 a	619 21,2 a	619 18,8 a	500 15,6 a	353 15,2 a	501 20,0 ab	353 18,7 a
353 15,2 a	500 14,1 ab	620 19,5 ab	501 17,3 ab	499 14,8 a	499 13,8 ab	499 19,3 ab	499 16,7 abc
458 13,9 a	457 11,8 bc	500 19,2 ab	620 15,4 bcd	620 13,8 a	617 11,2 bc	353 19,2 ab	617 15,2 bcd
457 13,7 a	458 10,4 c	458 19,0 ab	500 14,8 bcd	501 8,2 b	620 10,4 c	457 18,1 ab	618 14,3 cd
618 6,6 b	501 8,0 cd	618 16,9 b	458 14,0 cd	617 0,0 c	618 6,0 d	617 1,3 c	457 12,8 d

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. ⁽¹⁾C.V. = 11,84 % ⁽²⁾C.V. = 11,10
⁽³⁾C.V. = 10,31% ⁽⁴⁾C.V. = 9,36

Qualquer que seja o parâmetro considerado, índice enzimico ou diâmetro de degradação do amido, os isolados menos produtivos

foram 617 e 618. O primeiro foi o menos produtivo, enquanto que o 618, após a passagem em meio BDA, localizou-se em um grupo intermediário (Tabela 6), indicando que a capacidade de produção de enzima pode ser afetada pelo meio de cultura da transferência prévia. Assim, sua capacidade de produção de amilase foi menor quando transferido previamente para meio mínimo.

Os isolados que apresentaram maior crescimento da colônia no 6º dia após a repicagem de meio mínimo e BDA foram o 619, 353 e 499. O isolado 618 foi o que apresentou menor crescimento das colônias, após a repicagem em ambos meios, ficando os demais isolados em um grupo intermediário, cujos crescimentos variaram em função do meio de cultura utilizado nas repicagens prévias à avaliação.

4.1.2.3. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica, expressa mediante índice enzimico, consta na tabela 8.

Tabela 8. Produção de protease de *Beauveria* spp., expressa como índice enzimático, após repicagem em meio mínimo. Colônias de diferentes idades incubadas a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h.

Isolados	Índice proteolítico após (dias)									
	4		5		6		7		Média	
617	1,13	a	1,31	a	1,10	c	1,16	cdef	1,18	de
618	1,10	a	1,25	ab	1,07	c	1,15	def	1,14	e
619	1,14	a	1,18	abc	2,30	a	1,13	ef	1,44	a
620	1,18	a	1,13	bc	1,97	b	1,10	f	1,34	b
353	1,10	a	1,12	bc	1,11	c	1,70	a	1,26	c
458	1,13	a	1,09	c	1,16	c	1,24	cdef	1,14	e
499	1,09	a	1,08	c	1,09	c	1,27	cd	1,13	e
457	1,17	a	1,07	c	1,20	c	1,54	b	1,24	cd
500	1,15	a	1,05	c	1,16	c	1,26	cde	1,16	e
501	1,19	a	1,05	c	1,16	c	1,30	c	1,18	de

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade .C.V. = 6,49 %

O isolado mais produtivo, quando considerados conjuntamente o índice enzimático (Tabela 8) e o diâmetro enzimático (Tabela 10), foi o 619.

Ao ser analisado o índice proteolítico, na média dos 4 dias, o segundo isolado mais produtivo foi o 620, enquanto que, quando

analisada a produção de protease, expressa pelo diâmetro do halo, foi constatado que o mesmo isolado localiza-se no grupo dos menos produtivos. Isto se deve ao fato deste ter apresentado menor halo de degradação e menor taxa de crescimento.

O segundo isolado mais produtivo, considerando o halo enzimico, foi o 818, embora seu índice enzimico o coloque entre os menos produtivos, por uma razão análoga à exposta anteriormente. Para ambos os parâmetros, índice enzimico e halo, houve interação significativa entre isolados e dias para o caráter produção de protease, sendo que, de um modo geral, a produção de protease foi maior quando decorridos 7 dias da incubação.

Tabela 9. Produção de protease de *Beauveria* spp. provenientes de meio mínimo, expressa como índice enzimico, após diferentes períodos de incubação. Colônias incubadas a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h.

dia	índice enzimico (média geral)	
-----	-----	
6	1,33	a
7	1,28	b
4	1,14	c
5	1,13	c

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 6,49 %.

Pela tabela 9, observa-se que o índice enzimico foi maior no

6^o dia de incubação. Isto ocorreu em função da elevada produção de protease do isolado 619 de *B. brongniartii*, que contribuiu sobremaneira para o aumento da média geral. Se não for considerada a produção deste isolado, a produção da maioria dos isolados foi maior no 7^o dia da incubação. Entretanto, neste dia, os limites deste halo se apresentaram difusos e confluentes. Portanto, para realizar as avaliações deste parâmetro deve-se considerar o 6^o dia de incubação, quando este problema não ocorreu.

Tabela 10. Produção de protease de isolados de *Beauveria* spp. expressa em diâmetro do halo (mm), após repicagem em meio mínimo. Colônias incubadas a $26 \pm 0,5$ °C e fotofase de 12 h.

		Halo proteolítico após (dias)				
Isolados	4	5	6	7	Média	
618	22,50 a	27,17 a	30,75 a	35,17 b	28,90 a	
619	19,58 b	26,42 a	32,08 a	38,58 a	29,17 a	
499	14,50 c	19,92 b	24,75 b	30,00 c	22,27 c	
500	14,38 c	20,00 b	25,25 b	30,50 c	24,44 b	
458	13,58 cd	18,08 b	22,25 c	27,08 d	20,25 de	
617	13,33 cd	18,08 b	23,17 bc	28,67 cd	20,81 d	
620	13,17 cd	18,17 b	23,50 bc	28,75 cd	20,90 cd	
457	12,83 cd	17,42 b	21,92 c	26,83 d	19,75 de	
353	12,50 cd	17,83 b	23,33 bc	28,83 cd	20,62 d	
501	11,83 d	17,42 b	22,17 c	26,75 d	19,10 e	

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV = 6,91 %

Os isolados que apresentaram maior halo proteolítico foram 619, 618 e o 500 (Tabela 10). Os isolados 501, 353, 457, 458 e 617 foram os menos produtivos e os demais isolados ficaram em um grupo intermediário de produção enzimica.

O isolado 619 de *B. brongniartii* apresentou claramente elevada capacidade de produção de lipase, amilase e protease. Para a amilase esta capacidade só ficou evidenciada quando considerado o diâmetro de degradação do amido.

Tabela 11. Produção de protease de *Beauveria* spp., expressa em diâmetro do halo (mm), proveniente de meio mínimo, após diferentes períodos de incubação. Colônias incubadas a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h.

dias -----	diâmetro do halo (média geral) -----	
7	30,1500	a
6	25,0667	b
5	20,2083	c
4	15,0583	d

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 6,91 %

Pode-se observar, pela tabela 11, que o maior diâmetro do halo proteolítico ocorre após 7 dias de incubação, mas também neste caso as avaliações deverão ser feitas decorridos 6 dias, pelas mesmas razões expostas anteriormente.

4.1.3. Crescimento e conidiogênese "in vitro" dos isolados de *Beauveria* spp.

4.1.3.1. Crescimento dos isolados a diferentes temperaturas

As comparações do crescimento de cada isolado nas diferentes temperaturas encontram-se na Tabela 12.

As comparações do crescimento entre isolados dentro de cada temperatura encontram-se na Tabela 13.

Tabela 12. Média dos diâmetros das colônias (mm) de *Beauveria* spp., em meio BDA, após 6 dias de crescimento à 4 temperaturas diferentes e fotofase de 12 h.

Temp.	Isolados									
	353	457	458	499	500	501	617	618	619	620
22°C	20,58 b	16,58 b	15,33 b	17,00 b	18,25 b	14,25 b	19,17 b	15,83 b	19,33 a	15,75 b
26°C	23,58 a	18,83 a	19,25 a	19,17 a	23,58 a	20,67 a	22,50 a	19,08 a	19,08 a	19,58 a
30°C	19,83 b	12,58 c	11,83 c	19,00 a	16,50 c	21,00 a	17,33 c	16,00 b	16,58 b	16,42 b
34°C	0,00	0,00	0,00	0,40 c	0,00	1,75 c	1,25 d	1,08 c	0,92 c	1,42 c

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade .C.V.= 7,20 %

A temperatura mais apropriada para o crescimento de *Beauveria* foi $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, embora alguns isolados não tenham sido afetados

por temperaturas maiores ($30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) como no caso do isolado 499 e 501, ambos provenientes da Argentina ou por temperaturas menores ($22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) como no caso do isolado 619, de *B. brongniartii*. Para esta última espécie, CORDON e SCHWARTZ (1962) observaram que um isolado apresentava um ótimo crescimento entre 28 e 30°C sendo que a 25°C crescia lentamente. Este fato evidencia a grande variabilidade das raças quanto aos requerimentos térmicos. De modo geral, a temperatura de 22°C foi mais favorável ao crescimento das colônias dos isolados que a temperatura de 30°C embora alguns isolados tenham se comportado melhor a 30°C , como o 499 e 501 (Tabela 12).

A temperatura de 34°C foi limitante para o crescimento de *Beauveria* (Figura 2), diferindo em todos os casos das outras temperaturas testadas (Tabela 12).

Figura 2. Crescimento do isolado 620 de *Beauveria bassiana* durante 6 dias a $34 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em meio BDA e fotofase de 12 h.

De um modo geral, a temperatura de 34°C, nas condições testadas, teve um efeito fungistático durante 6 dias, pois as colônias transferidas para temperatura ambiente reiniciaram normalmente seu crescimento. Estes resultados são semelhantes aos de WALSTAD et alii (1970), que observaram um atraso no processo de germinação de esporos de *B. bassiana* entre 35° e 49 °C.

Tabela 13. Comparações do crescimento em diâmetro (mm) das colônias de *Beauveria* spp. em geral e a cada temperatura, após 6 dias de incubação. Fotofase de 12 horas.

Isol. diâm. 22°C		Isol. diâm. 26°C		Isol. diâm. 30°C		Isol. diâm. Geral	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
353	20,58 a	353	23,58 a	501	21,00 a	353	21,33 a
619	19,33 ab	500	23,58 ab	353	19,83 a	617	19,67 b
617	19,17 abc	617	22,50 abc	499	19,00 ab	500	19,44 b
500	18,25 bcd	501	20,67 c	617	17,33 bc	501	18,64 b
499	17,00 cde	620	19,58 c	619	16,58 c	499	18,39 bc
457	16,58 de	458	19,25 c	500	16,50 c	619	18,33 bc
618	15,83 ef	499	19,17 c	620	16,42 c	620	17,25 cd
620	15,75 ef	618	19,08 c	618	16,00 c	618	16,97 d
458	15,33 ef	619	19,08 c	457	12,58 d	457	16,00 de
501	14,25 f	457	18,83 c	458	11,83 d	458	15,47 e

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 6,98 %

Pela tabela 13 pode-se observar que o isolado 353 foi o que apresentou maior crescimento nas três temperaturas. O isolado 617 pode ser colocado entre os que apresentaram maior crescimento a 22° e 26 °C.

Por outro lado, os isolados 458 e 457 foram os que estiveram no grupo dos que apresentaram menor crescimento nas três temperaturas. Entre os isolados que desenvolveram a 34 °C não foi possível determinar diferenças de crescimento entre eles; porém, todos sofreram as consequências negativas desta temperatura. Os demais isolados apresentaram crescimento intermediário nas três temperaturas.

4.1.3.2. Conidiogênese dos isolados de *Beauveria* spp. sob diferentes temperaturas

O número de conídios formados pelas colônias de *Beauveria* spp. sob diferentes temperaturas, em meio BDA, consta na Tabela 14.

Tabela 14. Produção de conídios por colônia ($n \times 10^6$) dos isolados de *Beauveria* spp. a diferentes temperaturas.

Isol.	22°C	Isol.	26°C	Isol.	30 °C	Isol.	média geral
457	425,4375 a	457	367,2500 a	617	100,3500 a	457	278,8229 a
458	374,7375 a	458	277,8124 ab	618	54,6362 ab	458	228,2854 ab
617	150,5875 b	617	269,5744 ab	457	43,7812 ab	617	173,5040 b
620	126,3750 bc	501	218,7488 bc	458	32,3062 b	620	103,1625 c
353	68,8350 bcd	620	152,7250 cd	620	30,3875 b	501	102,4803 c
501	67,6733 cd	500	147,1000 cd	353	30,0870 b	353	61,3490 cd
499	55,9550 de	353	85,1250 de	501	21,0400 b	500	74,8855 cd
500	57,8129 de	499	78,7762 de	619	19,6037 b	499	51,9238 de
619	10,7975 e	618	39,4288 e	499	21,0400 b	618	34,2058 de
618	8,5525 e	619	37,3314 e	500	19,7438 b	619	22,5775 e

Os valores seguido de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 22,58 %

Os isolados que formaram maior número de conídios a 22 e 26 °C foram 457, 458 e 617 sendo que a 30 °C o isolado 458 ficou

localizado num segundo grupo, e na mesma temperatura, o isolado 618 passou do grupo que apresentava menor esporulação à 22 e 26 °C ao grupo dos mais produtivos, indicando que o mesmo necessita de temperaturas mais elevadas para uma maior conidiogênese "in vitro".

Os isolados mais produtivos a 30 °C foram 617, 618 e 457. Os outros isolados não diferiram na produção de conídios. Em geral, os isolados 619 de *B. brongniartii*, 499 e 618 de *B. bassiana* foram os menos produtivos.

Devido ao efeito negativo da temperatura de 30 °C sobre a conidiogênese, as diferenças entre os isolados, nesta temperatura, foram menos acentuadas; assim, o único que diferiu dos demais foi o 617 (Tabela 14).

Tabela 15. Médias gerais e originais da produção de conídios ($\times 10^6$) nas diferentes temperaturas.

temp.	número de conídios	
26 °C	167,3872	a
22 °C	134,6764	b
30 °C	37,2954	c

Os valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 22,58 %

4.1.4. Bioensaios com os diferentes isolados de *Beauveria* spp.

Os resultados obtidos nos bioensaios com os isolados de *Beauveria* spp. em *D. saccharalis* constam na Tabela 16.

Tabela 16. Tempos Letais 50 (TL₅₀) resultantes da inoculação dos isolados de *Beauveria* spp. em lagartas de 4^o instar de *Diatraea saccharalis*, quando pulverizadas com suspensão de $2,7 \times 10^8$ conídios /ml.

Isolados	TL ₅₀	Int. Conf. (95 %)	equação da reta ⁽¹⁾	% mort. total
619	5,87 a	4,9 - 6,9	$y = 1,5810 + 4,4475. \log x$	76
618	5,95 a	5,3 - 6,7	$y = -0,8347 + 7,5322. \log x$	67
499	8,33 b	7,6 - 9,2	$y = 2,3180 + 2,9127. \log x$	67
457	9,28 b	8,1 - 10,7	$y = 0,8563 + 4,2827. \log x$	53
500	9,32 bc	8,0 - 10,8	$y = 2,5261 + 2,5521. \log x$	56
620	10,05 bcd	8,7 - 11,6	$y = 2,5182 + 2,4762. \log x$	56
617	10,27 cd	9,4 - 11,2	$y = 1,9819 + 2,9835. \log x$	56
458	11,21 cd	9,6 - 13,1	$y = 2,1205 + 2,7432. \log x$	50
501	12,30 d	11,1 - 13,6	$y = 2,3508 + 2,4303. \log x$	56
353 ⁽²⁾	---		-----	24

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

⁽²⁾ isolados que provocaram mortalidade menor que 50 %.

Os isolados mais virulentos foram 619 e 618, que apresentaram menor TL₅₀ e maior coeficiente angular da reta (Tabela 16).

MARTINS et alii (1987) determinaram , coincidentemente, que o isolado 619 (= CP -85 da micoteca do CNPAF) foi o mais virulento para *Tibraca limbativentris* da série de isolados testados.

O isolado 457 apresentou o mesmo tempo letal do 499 porém o primeiro teve um coeficiente angular da equação da reta maior que do isolado 499.

As relações entre virulência e capacidade de produção enzimica, estabelecidas por diferentes autores, são muito contraditórias. SILVA e MESSIAS (1986) observaram que mutantes de *M. anisopliae* com baixa capacidade de produzir lipase e amilase eram menos virulentos ; não sendo observado o mesmo resultado quanto protease. Para as enzimas lipase e amilase foi possível restituir a virulência nos revertantes. Contraditoriamente St. LEGER et alii (1988) determinaram que a protease é um fator chave na penetração de *M. anisopliae* na cutícula de *M. sexta*.

Considerando que a relação entre produção de lipase e virulência foi observada, para isolados de *B. brongniartii*, por PARIS e SEGRETAIN (1975) e PARIS e FERRON (1979) poderia se deduzir que a virulência do isolado 619 deve-se a esta característica. Por outro lado, o isolado 618 de *B. bassiana* também colocado entre os mais virulentos, não produziu lipase extracelular mas teve uma elevada atividade proteolítica (Tabela 10). Assim, estes resultados coincidiram com os de CHAMPLIN et alii (1981) e PEKRUL E GRULA (1979) que não encontraram relação entre produção de enzimas e virulência para *B. bassiana*.

Estes fatos indicariam que a produção de uma determinada enzima não é o único fator envolvido no fenômeno de virulência, como foi sugerido por PARIS e FERRON (1979), ou no sucesso na penetração das hifas (PEKRUL e GRULA, 1979).

Também pode se cogitar que, possivelmente, nem todas as enzimas com atividade lipolítica, proteolítica ou amilolítica estejam envolvidas no processo de patogênese. Assim, métodos diferentes, utilizados para detectar esta atividade, podem conduzir também a conclusões diferentes.

4.1.5. Padrões eletroforéticos dos sistemas de α -esterase dos isolados de *Beauveria* spp.

A variabilidade genética de *Beauveria* spp. pode ser mensurada mediante os padrões dos sistemas de α -esterase, como foi determinado por TIGANO (1985), POPRAWSKI et alii (1988), e PACCOLA-MEIRELLES (1988). Os desenhos esquemáticos dos mencionados padrões encontram-se representados na figura 3.

Por serem os isolados provenientes de diferentes regiões, fica claro que os mesmos diferem em seus padrões, e conseqüentemente, pertencem a raças geográficas diferentes, com a exceção dos isolados 457 e 458, que apresentaram o mesmo padrão. Por outro lado, os padrões dos isolados 500 e 501 também podem ser agrupados em uma mesma classe, embora sejam ligeiramente diferentes. Pela sua semelhança, os padrões obtidos podem ser agrupados nas seguintes classes: A) 457 e 458 B) 499 C) 617, 618, 619 e 620 D) 353, 500 e 501.

Fig.3. Zimogramas do sistema de α -esterases de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (isolados 353, 457, 458, 499, 500, 501, 617, 618, 620) e *B. brongniartii* (isolado 619).

4.1.6. Análise fenética de isolados de *Beauveria* spp.

Com os resultados obtidos na caracterização das 10 unidades taxonômicas operacionais (OTU's) elaborou-se uma matriz básica de 19 caracteres (Tabela 17). A mesma foi utilizada para se obter os valores de Distância Euclidiana Média, como medida de semelhança.

Na figura 4 consta o fenograma obtido mediante o método ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética, WPGMA (Weighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

Tabela 17. Matriz básica dos caracteres codificados em duplo estado para cada uma das OTU's em estudo.

	CARACTERES																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
353	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
457	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
458	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
499	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
500	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
501	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
617	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
618	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
619	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
620	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0

No fenograma da figura 4 se reconhece a maior distância, isto é, a menor similitude do isolado 619 de *B. brongniartii* em relação aos demais isolados. Dentro do grande grupo dos isolados de *B. bassiana*, os isolados 617 e 618, ambos coletados em Goiânia, ficaram relativamente afastados dos demais.

Fig. 4. Fenograma representativo das distâncias fenéticas dos isolados de *Beauveria* spp., por distância euclidiana média e método ponderado de agrupamento aos pares (WPGMA). Grau de encadeamento = 0,50. Coeficiente de Correlação Cofenético, CCC = 0,89.

O isolado 353 apresentou características de maior semelhança aos isolados da Argentina, enquanto que o isolado 620, embora oriundo de Chapecó (SC) foi mais semelhante aos isolados 457 e 458, coletados em Goiânia.

Também podem ser evidenciados dois grupos de isolados, muito próximos; um grupo formado pelo 500 e 501 e outro pelos isolados 457 e 458. O primeiro grupo constitui-se de isolados de regiões próximas de Tucumán, Argentina, e o segundo grupo formado por isolados provenientes de uma mesma região, Goiânia (Tabela 1).

Por sua vez, os isolados 500 e 501 ligaram-se ao 499, também de regiões próximas (Fig. 4), em um nível de semelhança maior que com os demais isolados.

Assim, observa-se a tendência de permanecerem agrupados aqueles isolados provenientes de locais geográficos mais próximos, sugerindo a ocorrência de populações geográficas com variabilidade intrínseca menor dentro da população, que a ocorrente entre populações geograficamente afastadas. Observações semelhantes foram realizadas por POPRAWSKI et alii (1988), embora estes autores consideraram um único caráter, isoenzimas, para análise. Mediante a análise dos componentes principais obteve-se os valores expressados nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Autovalores obtidos da análise dos componentes principais em 287 rotações.

Eixos	Autovalores	% de explicação acumulado
-----	-----	-----
1 (x)	4,893	24,7
2 (y)	4,155	46,6
3 (z)	2,807	61,4
4	2,159	72,8
5	1,855	82,6
6	1,221	89,0
7	0,982	94,2
8	0,698	97,9
9	0,428	100
10 a 19	0,000	--

Pelos dados da tabela 18 infere-se que a explicação até o terceiro eixo alcançou 61,4 % .

Tabela 19. Autovetores obtidos da análise dos componentes principais .

Caracteres	Primeiro componente	Segundo componente	Terceiro componente
1	0,273	0,353	-0,146
2	-0,226	-0,067	0,412
3	-0,208	0,237	-0,008
4	0,356	-0,002	-0,021
5	-0,036	0,132	-0,072
6	-0,103	-0,258	-0,209
7	-0,096	0,247	-0,104
8	0,053	0,092	-0,338
9	-0,196	-0,367	0,304
10	-0,195	-0,052	0,146
11	-0,037	-0,237	0,236
12	0,732	-0,074	0,278
13	0,141	0,037	0,430
14	-0,045	0,147	0,021
15	0,153	-0,248	-0,090
16	0,018	0,026	0,068
17	-0,124	0,123	-0,028
18	0,017	-0,016	-0,137
19	0,077	-0,600	-0,412

Mediante os valores dos eixos ortogonais ajustados apropriadamente, confeccionou-se o gráfico tridimensional da figura 5.

Fig. 5. Análise dos componentes principais do gênero *Beauveria* spp.. Gráfico tridimensional com a projeção das OTU's nos tres primeiros componentes, o que representa 61,4 % da variação total.

Considerando os valores dos autovetores (tabela 19), separaram-se os caracteres de maior contribuição para a separação das OTU's.

O gráfico tridimensional da figura 5 representa as OTU's localizando-as dentro do espaço delimitado pelos três componentes principais. As OTU's mais próximas possuem maior relacionamento. Assim, podem ser discutidos os mesmos aspectos considerados quando analisado o fenograma.

O primeiro componente foi útil para discriminar o isolado 619 do grupo formado pelos demais isolados, sendo que os caracteres mais importantes foram: 12)- índice proteolítico aos 6 dias após a transferência do meio mínimo, 4)-índice amilolítico aos 6 dias após a transferência do meio mínimo, 1)-comprimento de conídios e 2)- produção de lipase extracelular.

O segundo componente discriminou os isolados 618, 457 e 458 dos demais isolados e os caracteres que mais contribuíram foram: 19)- valor da tangente do ângulo da reta de mortalidade versus tempo, 9)-diâmetro da colônia aos 5 dias sobre meio para detecção de amilase, após a transferência de BDA, 1)- comprimento de conídios e 6)- diâmetro do halo amilolítico aos 6 dias, após a transferência de meio mínimo.

O terceiro componente discriminou os isolados 457, 458 e 620 dos demais, sendo os caracteres mais importantes: 13) índice proteolítico geral, após a transferência de meio mínimo, 2)-produção de lipase extracelular, 19) valor da tangente do ângulo da reta de mortalidade versus tempo e 8) índice amilolítico aos 6 dias, após a transferência de meio BDA.

Entre os princípios do feneticismo consta que as classificações devem ser feitas com grande número de caracteres (CRISCI e ARMENGOL, 1983); porém na literatura existem muitos trabalhos considerando unicamente os padrões eletroforéticos ou enzimas, podendo ser citados os de BOUCIAS et alii (1982), POPRAWSKI et alii (1988), MCCOY e BOUCIAS (1989) e COSTAMILAN (1989). Por tal motivo, reafirma-se a necessidade da utilização de diversos e numerosos caracteres para os estudos de variabilidade genética e diferenciação de raças de fungos entomopatogênicos.

4.2. Conidiogênese de *B. bassiana* sobre cadáveres de hospedeiros

4.2.1. Curvas de conidiogênese através do tempo

O número de conídios formados sobre os cadáveres de *D. saccharalis* nas diferentes condições de umidade relativa, a temperatura constante ($26 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$) por diferentes períodos, constam na tabela 20 e figura 6.

Tabela 20. Número de conídios ($n \times 10^6$) formados sobre lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* a $26 \pm 0,5$ °C, 90 e 100 % de UR, durante diferentes períodos de tempo.

Isol.	UR(%)	Dias após a inoculação									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
499	90	0,0164	142,8516	301,8164	809,8829	1393,1564	1389,8438	1278,9141	947,2500	2175,4688	2743,9454
	100	0,0875	39,8583	135,5096	1264,4447	897,8959	1827,9167	2287,0833	3539,3747	2298,7993	3700,8333
618	90	0,0203	2,3312	11,6883	91,8875	76,1005	46,3922	100,5127	61,1719	140,9249	339,7500
	100	0,0219	4,0154	21,9804	8,7395	489,7468	705,9855	663,1719	123,4437	715,8125	690,1875

O número de conídios formados sobre os cadáveres dos insetos é função da umidade, temperatura, espécie hospedeira, patótipo e tempo. Após 24 h da morte das lagartas é possível observar a formação incipiente de micélio. É provável que na contagem de conídios às 24 h estejam sendo considerados, também, os conídios retidos sobre corpo das lagartas após a inoculação.

Fig. 6. Conidiogênese dos isolados 499 e 618 de *Beauveria bassiana* sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* de 5^o instar de 20 ± 1 mm, a 90 e 100 % de umidade relativa durante 10 dias a $26 \pm 0,5$ °C.

Quando se varia o parâmetro tempo e se fixam os outros fatores, o número de conídios formados pode ser explicado por uma função logística (umidade relativa de 100 %, figura 7), ajustando-se a uma função linear (isolado 499 a 90 % UR), ou apresentando-se um comportamento sem padrão definido (isolado 618 a 90 %) (Fig. 6).

Assim, para cada isolado, em uma atmosfera com a temperatura e umidade relativa controlada tem-se:

Isolado 499

$$\text{a } 90 \% \text{ UR} \quad y = -376,0125 + 269,7637 x$$

$$r = 0,89$$

$$\text{a } 100 \% \text{ UR} \quad y = \frac{3459,5059}{1 + e^{(4,3851 - 0,7499 x)}} \quad r^2 = 0,96$$

Isolado 618

$$\text{a } 100 \% \text{ UR} \quad y = \frac{686,0403}{1 + e^{(27,7290 - 5,7290 x)}} \quad r^2 = 0,99$$

onde y = número de conídios de *B. bassiana* formados sobre lagartas de 5 instar de 20 ± 1 mm de comprimento.

Embora o isolado 618 tenha sido o menos produtivo em número de conídios (Fig.6), o mesmo apresenta a característica de ter um crescimento profuso, formando sinêmios muito conspícuos (Fig. 8). Por sua vez, as lagartas mortas por este isolado, após 10 dias, apresentaram como particularidade certa coesão dos seus tecidos, sendo relativamente resistentes à desintegração. Por outro lado, o isolado 499, desintegrou totalmente as lagartas após sua esporulação, transformando-as em uma massa pulverulenta. Na figura 7 observa-se que a taxa de maior conidiogênese ocorre entre o 4º e 7º dia da morte das lagartas.

Fig.7. Conidiogênese dos isolados 499 e 618 de *Beauveria bassiana* a 100 % de umidade relativa sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* de 5^o instar e 20 $\pm$ 1 mm, durante 10 dias. (○) valores observados e (+---+) valores teóricos.

O isolado 499 possui características definidas, do tipo que apresentam esporo seco ("dry spore"), muito semelhantes às dos patótipos de *N. rileyi* observados nos períodos de elevada prevalência da doença.

O número de conídios formados pelo isolado 499 foi superior ao observado por KISH e ALLEN (1976) para *N. rileyi* sobre lagartas do mesmo tamanho (20 ± 1 mm) em condições de saturação de umidade, enquanto que o isolado 618 apresentou valores próximos aos observados por estes autores. Por outro lado, no trabalho de TEIXEIRA ALVES (1986), os valores de conidiogênese observados pelo autor, para os diferentes isolados de *M. anisopliae*, são próximos aos do isolado 499 e muito superiores aos do isolado 618, em condições ambientais semelhantes e igual tempo de incubação.

Fig. 8. Formação de sinêmios pelo isolado 618 de *Beauveria bassiana*, em condições de baixa intensidade de iluminação.

4.2.2. Conidiogênese de *B. bassiana* a diferentes umidades relativas e temperaturas

4.2.2.1. Conidiogênese sobre pentatomídeos

As porcentagens de insetos que apresentaram esporulação de *B. bassiana*, nas diferentes temperaturas e umidade relativa de 90 %, constam na Tabela 21.

Tabela 21. Porcentagem média de pentatomídeos que apresentaram esporulação do isolado 618, a 90 % de umidade relativa em diferentes temperaturas, com os respectivos números de conídios.

temperatura	Nezara viridula 7 dias		Piezodorus guildinii 10 dias			
	4 ^o instar		5 ^o instar		adulto	
	%	$n \times 10^6$	%	$n \times 10^6$	%	$n \times 10^6$
22 °C	90	2,4950	100	73,656 ab	100	43,158 a
26 °C	85	4,574	100	89,068 a	62	16,565 b
30 °C	55	2,877	100	26,186 b	50	4,416 b
34 °C	0	-	0	-	0	-

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

Em nenhum caso houve esporulação de *B. bassiana* em umidades relativas iguais ou inferiores a 75 %. Esses dados não concordam com os resultados obtidos por RAMOSKA (1984), que obteve esporulação a 75 % de U R sobre *Blissus leucopterus*.

Isto pode ser devido a diferenças entre hospedeiros ou alguma variação dos níveis de umidade nos métodos utilizados ou a diferenças de comportamento entre isolados. Por outro lado, estes resultados são coincidentes com os obtidos por FERNANDES et alii (1989). A tendência geral foi a de ocorrer maior número de cadáveres com esporulação nas ninfas do que nos adultos (Tabela 21).

Em relação a temperatura, observa-se na Tabela 21 que houve conidiogênese a 30 °C, enquanto FERNANDES et alii (1989) não observaram esporulação a esta temperatura. Este fato pode ser devido, principalmente, a diferenças entre isolados e hospedeiros utilizados.

As contagens do número de conídios foram realizadas antes (7 dias), no caso de *N. viridula*, devido à facilidade no desenvolvimento de contaminantes, que ocorrem principalmente nas ninfas. Embora as diferenças no número de conídios não sejam comparáveis, devido a superfície dos espécimens, o fato de se apresentarem menores porcentagens de insetos com esporulação indica que este isolado (618) de *B. bassiana* não se desenvolve profusamente sobre *N. viridula* ao nível de 90 % de umidade. Por outro lado, *P. guildinii* mostrou-se como um hospedeiro mais favorável, pois observa-se que todos os insetos apresentaram esporulação nos três níveis de temperatura, sendo provável que isto ocorra em função da desidratação rápida que sofrem as ninfas de *N. viridula* após sua morte ou ao desenvolvimento de maior número de contaminantes.

Quando compara-se o número de conídios formados sobre as ninfas e adultos de *P. guildinii*, observa-se a formação de um maior número sobre as ninfas. Assim, o número de conídios formados além de ser função da superfície do hospedeiro, depende da facilidade com que o fungo pode realizar sua extrusão através do tegumento do seu hospedeiro; é possível que estas diferenças não sejam tão acentuadas decorrido um tempo maior para a conidiogênese. De um modo geral, *P. guildinii* apresenta menor resistência aos isolados de *Beauveria* spp. que *N. viridula* (SOSA GÓMEZ e MOSCARDI, não pub.) e, por outro lado, um hospedeiro que fornece melhores condições para a formação de conídios que *N. viridula*, indicando ser possível seu controle com menor dificuldade que esta última espécie. Além disso, também deve-se considerar que *N. viridula* fica exposto sobre a parte aérea da soja e do feijão de corda durante as horas do dia que ocorre maior irradiação de ultravioleta, fator muito importante na inativação de entomopatógenos. Segundo LOCKWOOD e STORY (1986) durante a manhã, 82 % do tempo de sua atividade *N. viridula* fica aquecendo-se ("basking") e 91 % do tempo permanece no topo das plantas. Dessa maneira, pode-se assumir que ocorre uma resistência aos seus patógenos decorrente, entre outros fatores, do seu comportamento.

Estes fatos também explicariam, a baixa frequência da doença provocada por *Beauveria* spp. sobre percevejos, como já foi constatado por MOSCARDI et alii (1987).

4.2.2.2. Conidiogênese de *B. bassiana* sobre lagartas de *D. saccharalis*

Os dados referentes a conidiogênese dos isolados 499 e 618 de *B. bassiana* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis*, submetidos a diferentes níveis de umidade relativa e temperatura encontram-se representados na tabela 22 e figura 9.

Tabela 22. Número de conídios ($n \times 10^6$) dos isolados 499 e 618 formados sobre lagartas de *D. saccharalis* de 5^o instar em diferentes condições de umidade e temperatura após 5 dias de incubação.

temperatura	Isolado	umidade relativa (%)				
		76,3	82,7	85,2	90,7	100
22 °C	499	2,3094	1,0609	6,6625	383,4375	740,8230
	618	0,2288	0,5051	1,0281	574,8438	579,6875
26 °C	499	0,3914	-	0,4383	1618,2810	1463,4380
	618	0,0000	0,1152	0,5388	482,1875	1117,8150
30 °C	499	0,0000	1,8266	0,2359	12,6700	661,4060
	618	0,0000	0,0000	0,0555	0,5864	230,2850
34 °C	499	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	618	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

ISOLADO 499

ISOLADO 618

Fig. 9. Conidiogênese dos isolados 499 e 618 de *Beauveria bassiana*, sobre lagartas de 5^o instar de *Diatraea saccharalis* de 20 ± 1 mm, incubadas sob diferentes condições de umidade relativa e temperatura durante 5 dias

A temperatura mais apropriada para a esporulação sobre os cadáveres das lagartas foi de 26°C para ambos os isolados, seguida de 22 °C, sendo a temperatura de 30 °C menos favorável, independentemente da umidade relativa (Tabela 23 e 25).

A conidiogênese esteve diretamente correlacionada com o teor de umidade relativa do ar, como acontece com a maioria dos fungos (CHAWKER, 1966). Assim, com umidade relativa de 100 % a quantidade de conídios formados e número de insetos com esporulação foi maior (Tabelas 22, 24, 26 e Fig. 9). A menor umidade que permitiu formação de esporos, nas três temperaturas, foi 75%. Dessa maneira, deve ser considerado este valor , para condições microclimáticas, na elaboração de modelos epizootiológicos. Na figura 9 pode-se observar a tendência de ocorrer maior esporulação a 22 °C em condições de umidade relativa iguais ou inferiores a 85 %. Esta mesma tendência foi observada por TEIXEIRA ALVES (1986), que encontrou que a temperatura de 22 °C pode amenizar o efeito prejudicial das baixas umidades relativas. Os dados das tabelas 22 foram representados em logaritmo (fig. 9) para se evidenciar o mencionado efeito.

O isolado 499 foi o que formou maior número de conídios à 22, 26 e 30 °C, independentemente da umidade testada, é uma característica que pode ser importante para o desenvolvimento de epizootias. Embora este patótipo não tenha se comportado como altamente virulento (item 4.1.4), deve-se considerar que foi isolado durante um período de elevada prevalência da doença e, portanto, potencialmente epizootico. O número de propágulos formados e sua característica de "esporo seco" favorecem sua disseminação e aderência no tegumento dos seus hospedeiros,

particularidades que, conjugadas a outros fatores podem condicionar epizootias.

Tabela 23. Efeito das diferentes temperaturas, em cada umidade relativa, sobre o número de conídios ($n \times 10^6$) do isolado 499 formados sobre lagartas de 5º instar de *D. saccharalis*.

Temp.	Umidade relativa			
	80%	85%	90%	100%
26°C	0,3914 a	0,4383 a	1618,2812 a	1463,4375 a
22°C	1,0609 a	6,6625 a	383,4375 b	740,8231 b
30°C	0,2359 a	1,8265 a	10,1931 c	661,4219 b

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 27,50 %

Tabela 24. Efeito das diferentes umidades relativas, em cada temperatura, sobre o número de conídios ($n \times 10^6$) do isolado 499 formados sobre lagartas de 5º instar de *D. saccharalis*.

Um. Rel.	Temperatura		
	22°C	26°C	30°C
100 %	740,8230 a	1463,4375 a	661,4219 a
90 %	383,4375 b	1618,2812 a	10,1931 b
85 %	6,6625 c	0,4383 b	1,8265 b
80 %	1,0609 c	0,3914 b	0,2359 b

Valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 27,50 %

Tabela 25. Efeito das diferentes temperaturas, em cada umidade relativa, sobre o número de conídios ($n \times 10^6$) do isolado 618 formados sobre lagartas de 5^o instar de *D. saccharalis*.

Temp.	Umidade Relativa			
	80 %	85 %	90 %	100 %
26°C	0,1152 a	0,5388 a	482,1875 a	1458,4375 a
22°C	0,5052 a	1,0280 a	574,8438 a	579,6875 b
30°C	0,0555 a	0,5864 a	--	230,2850 c

Os valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 36,72 %

Tabela 26. Efeito das diferentes umidades relativas, em cada temperatura, sobre o número de conídios ($n \times 10^6$) do isolado 618 formados sobre lagartas de 5^o instar de *D. saccharalis*.

Um. Rel.	Temperatura		
	22°C	26°C	Geral
100 %	579,6875 a	1458,4375 a	1019,0625 a
90 %	574,8438 a	482,1875 b	528,5156 b
85 %	1,0280 b	0,5388 c	0,7834 c
80 %	0,5052 b	0,1152 c	0,3102 c

Os valores seguidos de letras diferentes diferem pelo teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. C.V. = 25,61 %

A combinação de temperatura e umidade que fornece melhores condições para a formação de conídios foi 26 C e 100 % UR. Embora nas condições macroclimáticas este nível de umidade não seja freqüentemente alcançado, no microclima dos insetos é muito comum se encontrar umidades próximas à saturação, seja na proximidade das folhas (FERRO et alii, 1979; FERRO e SOUTHWICK, 1984) ou nas imediações do tegumento dos hospedeiros (RAMOSKA, 1984); este último local tem importância unicamente para o processo de germinação.

Alguns Entomophthorales, como *Neozygites floridana*, necessitam de UR maiores que 85 % para esporulação (SMITLEY et alii, 1986), enquanto que no presente trabalho, *B. bassiana* esporulou a 80 % de U R. As variações de umidade no interior dos dessecadores permitiram a conidiogênese, o que pode ter super-estimado o efeito deste fator; como a metodologia utilizada por SMITLEY et alii (1986) foi a adotada neste trabalho, os resultados podem ser comparáveis.

Os valores de número de esporos formados durante os ensaios foram muito variáveis, e por essa razão, os coeficientes de variação obtidos são elevados. Este fato é inevitável e decorre do método de contagem dos conídios bem como da variabilidade intrínseca dos fungos, sendo que coeficientes de variação similares já foram obtidos por SOSA GÓMEZ e ALVES (1983) e TEIXEIRA ALVES (1986).

4.3. Termohigrogramas

Os termohigrogramas, elaborados com base nas temperaturas e umidades relativas médias mensais, podem indicar as épocas com maiores possibilidades de ocorrência de epizootias ou enzootias para as diferentes regiões (Figs. 10 a 13).

Os valores máximos e mínimos de temperatura e umidade relativa considerados foram limitantes para crescimento e esporulação. Deve-se lembrar que os valores de temperatura e umidade foram obtidos em estações meteorológicas e que estes fatores no interior da cultura, ou ainda, na proximidade das folhas são modificados profundamente em relação ao macroclima. Assim, FERNANDES (1986) determinou que estes mesmos fatores, no microclima de uma planta de caupi, tiveram uma variação diária maior que a obtida na estação meteorológica, sendo que as plantas de caupi não cobriam 10 % da área.

Por outro lado, FERRO et alii (1979) e FERRO e SOUTHWICK (1984) determinaram que a temperatura e umidade no interior das macieiras de um pomar tiveram uma amplitude menor que a registrada em uma estação meteorológica. Estes trabalhos demonstram que a utilização de termohigrogramas baseada em dados macroclimáticos devem ser complementadas com observações de campo.

A influência do microclima da cultura é de tal magnitude que a ocorrência da doença pode ser antecipada em função da época de semeadura, como constatado por SPRENKEL et alii (1979).

Em função do exposto, a utilização de termohigrogramas, deve ser cautelosa. Ainda assim, podem ser bons indicadores das épocas de maiores probabilidades de ocorrência das doenças.

A figura 10 representa os dados de temperatura e umidade de Oliveros, Santa Fe, Argentina, plotados sobre os parâmetros ideais para a esporulação de *B. bassiana*. Por esses dados, observa-se que nessa região existem condições favoráveis para a ocorrência de doenças nos meses de março e abril, o que concorda com as observações de DIEZ (1986), que determinou uma elevada prevalência da doença provocada por *N. rileyi*, um entomopatógeno da mesma família de *B. bassiana* e com exigências de temperatura e umidade muito semelhantes. O referido autor constatou os primeiros casos da doença no mês de fevereiro elevando-se o número de casos no mês de abril, o que não ocorreu no mês de outubro, época na qual, embora possam ocorrer condições favoráveis, não existe densidade suficiente do hospedeiro para iniciar a doença.

Na região de Tucumán (fig. 11) o período favorável para a ocorrência de fungos com mesmas exigências térmicas e hídricas abrange o período de janeiro a abril. Entretanto, é possível detectar a ocorrência de *Hirsutella thompsonii* durante novembro (SOSA GÓMEZ e NASCA, 1983) e *Entomophthora* spp. sobre *Plusiinae*, a final de dezembro. Por outro lado, os isolados 499 e 501 foram coletados durante um período de alta prevalência da doença, em uma época muito favorável (março, abril) para *B. bassiana* (tabela 1).

Nas regiões de Campo Grande (fig. 12) e Londrina (fig. 13) também ocorrem períodos de elevada prevalência durante os meses que se localizam dentro dos limites do quadrado. Assim, na região de Londrina podem ser encontradas lagartas afetadas por *N. rileyi* desde o final de dezembro (MOSCARDI, F¹) ou mais freqüentemente a partir de janeiro, aumentando a prevalência até fevereiro (HOFFMANN et alii, 1979 e MOSCARDI & CORRÊA-FERREIRA, 1982). Após estes meses, a tendência geral é a diminuição de casos da doença, provavelmente pela ausência de hospedeiros.

Na mesma região o nível de inóculo de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no solo aumenta a partir de Janeiro (SOSA GÓMEZ e MOSCARDI, dados não pub.).

¹

MOSCARDI, F. (Centro Nacional de Pesquisa de Soja / EMBRAPA, Londrina). Comunicação pessoal, 1980.

Fig 10 .Termohigrograma representativo das épocas com maiores
 * possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico
Beauveria spp. correspondente a região de Oliveros, Santa
 Fé , Argentina.

Fig 11 .Termohigrograma representativo das épocas com maiores possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico *Beauveria* spp. correspondente a região de Las Talitas, Tucuman, Argentina.

Fig. 12 .Termohigrograma representativo das épocas com maiores possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico *Beauveria* spp. correspondente a região de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Fig. 13 .Termohigrograma representativo das épocas com maiores possibilidades de ocorrência do fungo entomopatogênico *Beauveria* spp. correspondente à região de Londrina, Paraná.

5. CONCLUSÕES

1 - Os isolados 353, 457, 458, 499 , 500, 501, 617, 618, 620 pertencem à espécie *B. bassiana*, enquanto o isolado 619 pertence espécie *B. brongniartii*.

2 - É possível efetuar a caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica com base nos caracteres empregados.

3 - A análise fenética agrupa os isolados de maior semelhança, ficando definida sua similitude, principalmente pela sua distribuição geográfica.

4 - Para estudos de conidiogênese as soluções saturadas de sais são mais apropriadas que as soluções de ácido sulfúrico.

5 - A temperatura melhor para desenvolvimento e conidiogênese de *Beauveria* spp. foi 26 °C. As temperaturas subótimas foram 22 e 30 °C, sendo, esta última geralmente menos favorável. A temperatura de 34 °C foi limitante, tendo efeito fungistático.

6 - A faixa de umidade relativa limitante para a conidiogênese dos isolados 499 e 618 de *B. bassiana* encontra-se entre 75 e 80 %. A umidade relativa ótima para conidiogênese foi 100 %; com níveis decrescentes de umidade, a formação de conídios diminuiu.

7 - A conidiogênese é função da umidade relativa, temperatura, hospedeiro (qualidade nutricional, superfície), tempo, ocorrência de contaminantes e isolados.

8 - Em condições ideais, a conidiogênese através do tempo segue o modelo das curvas logísticas, com equações de parâmetros diferentes segundo os isolados em estudo. A conidiogênese, em condições subótimas de umidade relativa (90 %) ajustou-se a uma função linear para o isolado 499 e foi errática para o isolado 618.

9 - Quando o hospedeiro utilizado *D. saccharalis* e as condições de umidade relativa são ótimas, a maior taxa de incremento do número de conídios ocorre entre o 4^o e o 7^o dia.

10 - Para a elaboração de climogramas podem ser utilizados os valores limites de 17 a 30 °C e 75 % de UR, quando considerados fungos entomopatogênicos com exigências semelhantes as de *B. bassiana*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AIDROOS, K. & SEIFERT, A.M. Polysaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 36 (1): 29 - 34, 1980.
- ALLEN, G. E.; GREEN, G. L. & WHITCOMB, W. H. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* in Florida. *Florida Entomologist*, Gainesville, 54 : 189 - 191, 1971.
- ALVES, S. B. Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1982. 95 p. (Tese de livre docencia- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

ALVES, S.B. Epizootiologia. In: ALVES, S.B. (coord.) *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Editora Manole, 1986a. cap. 4, p. 28-72.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo. Editora Manole, 1986b. cap. 5, p. 73 -126.

ALVES, S.B.; RISCO, S.H. & ALMEIDA, L.C. Evaluation of spore amounts of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. produced per hectare during the epizootic phase of the disease on sugarcane leafhopper, *Mahanarva posticata*. *Entomology Newsletter*, Araras, (13) : 7, 1982.

ALVES, S.B.; RISCO, S.H. & ALMEIDA, L.C. Influence of photoperiod and temperature on the development and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, Berlin, 97 : 127 -129, 1984.

ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L. & SOSA GÓMEZ, D.R.

Separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., através de análise fenética. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, Porto Alegre, 15 (supl.) : 81 - 92, 1986.

- ANDERSON, R.M. Theoretical basis for the use of pathogens as biological control agents of pests species. *Parasitology* , 84 : 3 - 33 , 1982.
- BARSON, G. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* as a pathogen of the larval stage of the large elm bark beetle, *Scolytus scolytus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 29 (3): 361 - 366, 1977.
- BELL, J.V. Mycoses. In: CANTWELL, G.E. ed. *Insect diseases*, New York. Marcel Dekker, Inc. , 1974. cap. 4, p. 185 -236.
- BELL, J.V. & HAMALLE, R.J. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 15 : 447 -450, 1970.
- BORGES, V. Estudo de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. 1883 para controle de cigarrinhas das pastagens. Piracicaba, 1985 . 99 p .(Dissertação de mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- BOUCIAS, D.G.; MCCOY, C. W. & JOSLYN, D.J. Isozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutella thompsonii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York 39 : 329 - 337, 1982.

- BRADY, B.L. Fungi as parasites of insects and mites. *Biocontrol News and Information*, 2 (4): 281 - 296, 1981.
- CALTAGIRONE, L.E. Identifying and discriminating among biotypes of parasites and predators. In: Hoy, M.A. e Herzog, D.C. *Biological Control in Agricultural IPM Systems*. New York, Academic Press. 1985 . p. 189 -200.
- 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*. College Park, 74 (5): 617 - 621, 1981.
- CRISCI, J.V. & ARMENGOL, M.F.L. Introducción a la teoria y práctica de la taxonomia numérica. La Plata, Argentina. 1983. 132 p.
- CORDON, T.C. & SCHWARTZ, J.H. The fungus *Beauveria tenella*. *Science*, Washington, 138 : 1265 - 1266 , 1962.
- COSTAMILAN, L. M. Aspectos de variabilidade genética em nove nove isolados do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi*. 1989. 107 pp. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Rio Grande do Sul/ Porto Alegre).

- DE HOOG, G. S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium*, and *Acrodontium* gen. nov.. *Studies in Mycology*, 1 : 1 - 41, 1972.
- DIEZ, S.L. Incidencia del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre poblaciones naturales de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidóptera: Noctuidae). In: IX REUNION TÉCNICA NACIONAL DE SOJA. Resistencia. Chaco, Argentina, 1986. 5 a 8 de Outubro.p. 71 - 78.
- DOBERSKI, J.W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 37 :195 - 200, 1981.
- DUNN, P.H. & MECHALAS, B.J. The potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. as a microbial insecticide. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 5 :451 - 459, 1963.
- FARGUES, J. Etude des conditions d infection des larves de Doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill [Fungi Imperfecti]. *Entomophaga*, Paris, 17 (3): 319 - 337, 1972.

FERNANDES, P.M. Influência das temperatura, umidade relativa do ar e dose na eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Cerotoma arquata* Oliv. (Col.:Chrysomelidae). Piracicaba. 1986. 68 p. (Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz"/USP).

FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; MAGALHÃES, B.P. & ROBERTS, D.W. Efeito dos fatores físicos e bióticos na conidiogênese e sobrevivência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.no interior de cadáveres de *Cerotoma arquata* (Olivier, 1791) (Coleoptera : Chrysomelidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, Porto Alegre, 18 (supl.) : 147 - 156, 1989.

FERRO, D.N.; CHAPMAN, R.B. & PENMAN, D.R. Observations on insect microclimate and insect pest management. *Environmental Entomology*, College Park, 8 : 1000 - 1003, 1979.

FERRO, D.N. & SOUTHWICK, E.E. Microclimates of small arthropods estimating humidity within the leaf boundary layer. *Environmental Entomology* , College Park, 13 : 926 - 929. 1984.

FERRON, P. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* [Fungi Imperfecti: Moniliales] in imagines of *Acanthocelides obtectus* [Col.: Bruchidae]. *Entomophaga*, Paris, 22 (4): 393 - 396, 1977.

- FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*.
In: BURGESS, H.D. *Microbial Control of Pests and Plant diseases 1970 - 1980*. New York, Academic Press. 1981. cap. 24 p. 465 - 482.
- FUXA, J.R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Annual Review of Entomology*, Palo Alto, 32: 225 - 251, 1987.
- FUXA, J.R. & TANADA, Y. Epidemiological concepts applied to insect pathology. In: FUXA, J.R. e TANADA, Y. ed. *Epizootiology of Insect diseases*. New York. John Wiley & Sons 1987. cap. 1. p. 3 - 22.
- GABRIEL, B.P. Enzymatic activities of some entomophthorous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 11 (1) : 70 - 81, 1968.
- GETZIN, L.W. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hübner). *Journal of Insect Pathology*, 3 : 2 - 10, 1961.
- GLARE, T.R., MILNER, R.J. & CHILVERS, G.A. The effect of the environmental factors on the production, discharge, and germination of primary conidia of *Zoopthora phalloides* Batko. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 48 : 275 - 283, 1986.

- HADDAD, M.L. Análise de próbites. In: ALVES, S.B. coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo . Editora Manole, 1986. cap. 21, p. 374 - 383.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, Bronx, 67 : 597 - 607, 1975.
- HAMES, B.D. Gel eletroforesis of proteins: a practical approach. Hames , B.D. e Rickwood, D. ed. IRL Press Limited , Oxford Washington. 1981.
- HARPER, J.D. & CARNER, G.R. Incidence of *Entomophthora* sp. and other natural control agents in populations of *Pseudoplusia includens* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 22 : 80 - 85, 1973.
- HAWKER, L.E. Environmental influences on reproduction. In: Ainsworth, G. C. e Sussman, A.S. ed. *The fungi*. An Advanced Treatise. New York. Academic Press. 1966. cap. 14 p. 435.
- HOLDOM, D.G. Moisture requirements and field occurrence of *Entomophthora planchoniana* Cornu. In: PROC. 4 AUSTRALIAN APPLIED ENTOMOL. RES. CONF. Adelaide, South Australia, Sept. 24 - 28, 1984. pp. 368 - 374 .

- HOFFMANN, C.B.; FOERSTER, L.A. & NEWMAN, G.G. Incidência estacional de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 e *Plusia* spp. relacionada com fatores climáticos. In: I SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA. Londrina, 1978. Anais, PR. 1979. Vol. 3 p. 11 - 15.
- HUMBER, R.A. & SOPER, R.S. Catalog of strains. USDA-ARS Collection of entomopathogenic fungal cultures. Boyce Thompson Institute . Cornell University, Ithaca, New York. 1986. 56p.
- IAPAR. Características climáticas de Londrina. 2 ed. Fundação Instituto Agronômico do Paraná. Londrina, PR . Circular nº 5. Maio. 1982.
- IGNOFFO, C.M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In : BURGESS, H.D. *Microbial Control of pests and Plant Diseases 1970 - 1980*. New York , Academic Press. 1981. cap. 27 p. 513 - 538.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. & HOSTETTER, D.L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Environmental Entomology*, 5 (5): 935 - 936, 1976.
- KISH, L.P. & ALLEN, G.E. Conidial production of *Nomuraea rileyi* on *Pseudoplusia includens*. *Mycologia*, Bronx, 68 (2): 436 - 439, 1976.

- KISH, L.P. & ALLEN, G.E. The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatilis* in soybeans. I.F.A.S., University of Florida . 1978. 48 p.
- LECUONA, R.E. Controle microbiano de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1974) (Lep.:Pyralidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch e virus da granulose e simulação dos efeitos de sua aplicação. Piracicaba. 1986. 170 p. (Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- LING, A.J. & DONALDSON, M.D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 38 (2): 191- 200, 1981.
- LOCKWOOD, & STORY, . The diurnal ethology of the southern green stink bug *Nezara viridula*(L.) in cowpeas. *Journal of Entomological Science*, 21 (2): 175 - 184, 1986.
- MAC LEOD, D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany*, 32 : 818 - 890, 1954.
- MARTINS, J.F. S. ; MAGALHÃES, B. P. & LORD, G.C. Patogenicidade dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre

Tibraca limbativentris, percevejo do colmo do arroz. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. Campinas, 1987. Resumos São Paulo .Vol. 1. 1987. p. 188.

McCOY, C. W. & BOUCIAS, D.G. Selection of *Beauveria bassiana* pathotypes as potential microbial control agents of soil-inhabiting citrus weevils. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1 Simposio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores. 84, Supl. 3: 75 - 80. 1989.

MENDES, A.C.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N. & ARAUJO, S.M.S.S. Desenvolvimento do combate biológico da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1974) (Lep.: Pyralidae), na Coordenadoria regional Sul, importância , resultados e perspectivas futuras. In: ENCONTRO NACIONAL DOS ENTOMOLOGISTAS DO IAA/ PLANALSUCAR, 5 Itajaí. 1980. 14 a 19 de abril.

MILLSTEIN, J.A.; BROWN G.C. & NORDIN, G.L. Microclimatic moisture and conidial production in *Erynia* sp. (Entomophthorales : Entomophthoraceae): in vivo production rate and duration under constant and fluctuating moisture regimes. *Environmental Entomology*, College Park, 12 : 1344 - 1349, 1983.

MOORE, G.E. Isolating entomogenous fungi and bacteria and test of fungal isolates against the southern pine beetle. *Journal of Economic Entomology*, College Park, 63 (5): 1702 - 1704, 1970.

- MORAES, S.A. & ALVES, S.B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In : ALVES, S.B. coord. *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo. Editora Manole. 1986. cap. 14 p. 278 -288.
- MOSCARDI, F. & CORRÊA-FERREIRA, B.S. Efeito de diferentes espaçamentos de soja na eficiência de amostragens de pragas da soja e na incidência do fungo *Nomuraea rileyi*. In: CNPSo/EMBRAPA ed. *Resultados de Pesquisa de soja 1981/1982*. Londrina ,PR. 1982. p. 259 - 265.
- MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B.S.; QUINTELA, E.D. & LEITE, L.G. Ocorrência e patogenicidade de fungos entomogenos sobre percevejos praga da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. Campinas, 1987. Vol. 1 . Resumos, 1987. p. 189.
- PACCOLA MEIRELLES, L.D. Variabilidade e recombinação genética no deuteromyceto *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Piracicaba, São Paulo. 1988. 193 p. (Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii* (= *Beauveria tenella*). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 34 (1): 71 - 77, 1979.
- PARIS, S. & SEGRETAIN, G. Etude de l'activite lipasique estearasique intracellulaire de *Beauveria tenella*. *Annales de Microbiologie Institut Pasteur*, Paris, 129 (2): 133 - 145, 1978.

- PARIS, S. & SEGRETAINE, G. Caracteres physiologiques de *Beauveria tenella* en rapport avec la virulence de souches de ce champignon pour la larve de hanneton commun, *Melolontha melolontha*. *Entomophaga*, Paris, 20 (2): 135 - 138, 1975.
- PEDIGO, L.P.; STONE, J.D. & LENTZ, G.L. Biological synopsis of the green cloverworm in Central Iowa. *Journal of Economic Entomology*, College Park, 66 : 665 - 673, 1973.
- 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*, College Park, 34 (3): 238 - 247, 1979.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONDS, L.M. McDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 15: 141 - 238, 1953.
- POPRAWSKI, T.J.; RIBA, G. ; JONES, W. A. & AOUN, A. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) isolated from Sitona weevils (Coleoptera : Curculionidae). *Environmental Entomology*, College Park, 17 (2) : 275 - 279, 1988.
- RAJAMANI, S. & HILDA, H. Plate assay to screen fungi for proteolytic activity. *Current Science*, 56 (22) : 1179 -1181, 1987.

- RAMOSKA, W.A. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity, and replication in the chinch bug *Blissus leucopterus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 43 : 389 - 394, 1984.
- RIBA, G. Application en essais parcellaires de plein champ d'un mutant artificiel du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Hyphomycete) contre la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* [Lep.:Pyralidae]. *Entomophaga*, Paris, 29 (1): 41 -48, 1984.
- RIBA, G. & MARCANDIER, S. Influence de l'humidité sur l'agressivité et la viabilité des souches de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin et de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, hyphomycetes pathogènes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübn. *Agronomie*, 4 (2) : 189 -194, 1984.
- ROBERTS, D. W. World picture of biological control of insect by fungi. *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz*. 1^o Simposio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores, Rio de Janeiro, 4 3 (supl.): 89 - 100, 1989.
- ROBERTS, D.W. & YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGESS, H.D. e HUSSEY, N.W. eds. *Microbial Control of insect and mites*. London, New York. Academic Press. pp. 125 - 149. 1971.

- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; SHEPARD, B. M. & ROBERTS, D.W.
Infection of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*
(Homoptera : Delphacidae), by field application of
entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environmental*
Entomology, College Park, 15 (5) :1070 - 1073, 1986.
- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Production of
extracelular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*.
Journal of Invertebrate Pathology, New York, 38 (1): 1- 3,
1981.
- SAMAD, M.Y.A.; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B.; YUNUS, W.M.Z.; AMPON,
K. & BASRI, M. A plate assay for primary screening of lipase
activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9 : 51 - 56,
1989.
- SCHAERFFENBERG, B. Biological and environmental condition for the
development of mycose caused by *Beauveria* and *Metarhizium*.
Journal of Insect Pathology , 6 : 8 - 20, 1964.
- SILVA, J. C. & MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and revertants
of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius*
prolixus. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 48 (3) :
368 -374, 1986.
- SILVEIRA NETO, S; NAKANO, O.; BARBIN, D. & VILLANOVA, N.A. Manual
de Ecologia dos Insetos . Piracicaba. Editora Agronomica
Ceres. pp. 419. 1976.

SOSA GÓMEZ, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. I. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. *Cirpon Revista de Investigacion*, 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 conidios con luz ultravioleta y zimogramas del sistema de α -estearasas. *Cirpon Revista de Investigacion*, Tucuman, 2 (1-2) : 47 -54, 1984.

SOSA GÓMEZ, D.R. & NASCA, A.J. Primera cita del hongo patógeno de ácaros, *Hirsutella thompsonii* Fisher, 1950, para la República Argentina. *Cirpon Revista de Investigacion*, Tucuman, 1 (3) : 137 - 141, 1983.

SPRENKEL, R.K.; BROOKS, W.M.; VAN DUYN, J.W. & DEITZ, L.L. The effects of three cultural variables on the incidence of *Nomuraea rileyi*, phytophagous lepidoptera. and their predators on soybeans. *Environmental Entomology*, College Park, 8 : 334 - 339, 1979.

St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A. K. & COOPER, R.M. Enzymatic characterization of entomopathogen with the API ZYM system. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 48 : 375 - 376, 1986.

- St. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K. & COOPER, R.M.
 Role of extracellular chymoelastase in the virulence of
Metarhizium anisopliae for *Manduca sexta*. *Journal of*
Invertebrate Pathology, New York, 52 (2): 285 - 293, 1988.
- TEIXEIRA ALVES, R. Determinação das exigências térmicas e
 hídricas do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin,
 1883. Piracicaba, São Paulo. 1986. 131 p. (Dissertação de
 Mestrado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- TIGANO, M. Contribution à l'étude de la variabilité génétique de
Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin hyphomycète
 entomopathogène. Paris, França. 1985. 175 p. (Thèse de
 Doctorat de L'Université Paris VI)
- WALSTAD, J. D.; ANDERSON, R.F. & STAMBAUGH, W.J. Effects of
 environmental conditions on two species of muscardine fungi
 (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of*
Invertebrate Pathology, New York, 16 : 221 - 226, 1970.
- WINSTON, P.W. & BATES, D.H. Saturated solutions for the control of
 humidity in biological research. *Ecology*, 41 (1) : 232 - 237,
 1960.