EFEITOS DE FORMULAÇÕES NA PRESERVAÇÃO DE
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.
e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

EDMILSON JACINTO MARQUES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Marques, Edmilson Jacinto
M357e Efeitos de formulações na preservação de *Beauveria*
bassiana (Bals.) Vuill. e de *Metarhizium anisopliae*
(Metsch.) Sorok. sob diferentes condições de armazena-
mento. . Piracicaba, 1993.
146p. ilus.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Inseticida biológico - Formulação 2. Fungo ento-
mopatogênico 3. Praga agrícola - Controle biológico
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pi-
racicaba

CDD 632.951

EFEITOS DE FORMULAÇÕES NA PRESERVAÇÃO DE
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.
e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

EDMILSON JACINTO MARQUES

Aprovada em 16.12.93

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves	ESALQ/USP
Prof. Dr. Octávio Nakano	ESALQ/USP
Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. Newton Macedo	UFSCar/Araras
Prof. Dr. Paulo Sérgio Machado Botelho	UFSCar/Araras

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves
Orientador

*À minha mãe Nair,
minha esposa e companheira Irene
e às minhas filhas Candice e Celeste*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece às pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução dessa pesquisa, sobretudo as relacionadas abaixo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves pela orientação constante, estímulo e amizade, propiciando condições à elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sinval Silveira Neto pelas sugestões, estímulo e amizade.

Aos Professores do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP pelos ensinamentos e distinção que nos trataram durante nossa estada neste Departamento.

Ao Engenheiro Agrônomo Carlos Eduardo Ferreira Pereira, Ex-Superintendente do Instituto do Açúcar e do Alcool, pelo esforço em obter nossa liberação para realização do Curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Engenheiro Químico Nilson Toschi Augusto, do Centro Piloto de Formulações de Defensivos Agrícolas do Instituto Biológico de Campinas, pelas sugestões referentes aos agentes tensoativos utilizados nesta pesquisa.

À Profª Drª Marinéia de Lara Haddad pela realização das análises estatísticas.

À Bióloga Solange Aparecida Vieira, técnica do Laboratório de Patologia de Insetos, pela dedicação e constante colaboração na obtenção dos dados.

À Analista de Sistemas Regina Célia Botequio de Moraes, do Setor de Processamento de Dados do Departamento de Entomologia pela confecção dos gráficos.

Aos estagiários Ana Cláudia Pacheco e Rogério Biaggioni, do Laboratório de Patologia de Insetos pela colaboração prestada neste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação de Entomologia pela amizade e espírito de colaboração.

Ao Engenheiro Agrônomo MSc. Ricardo Otaviano Ribeiro de Lima, da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (UFRPE) pela valiosa colaboração em Recife, durante o período que permanecemos em Piracicaba.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia pelo atendimento atencioso.

À Kátia, M.P. de Andrade e Eliana, M.A. Sabino funcionárias da Biblioteca Central, pela dedicação e cordialidade.

Aos amigos Aline, Angela e Pedro Cruz, pelo inestimável apoio e ambiente familiar que nos proporcionaram durante nossa permanência em Piracicaba.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Produção e formulação de conídios	04
2.2. Produção e formulação de micélio	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Linhagens dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>	33
3.2. Inseto utilizado	33
3.3. Etapas da pesquisa	34
3.3.1. Passagem dos isolados do óleo Nujol para BDA com antibiótico, teste de patogenicidade em <i>D. saccharalis</i> e reisolamento dos fungos	34
3.3.2. Produção de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em meio semi-sólido	35
3.3.3. Testes com agentes molhantes e emulsificantes	36
3.3.4. Escolha de diluentes ou veículos	38
3.3.5. Escolha de adjuvantes	39
3.3.6. Formulações dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> com inertes e adjuvantes	39

3.3.6.1. Formulações com <i>M. anisopliae</i> (primeira fase)	40
3.3.6.2. Experimentos com as formulações de <i>M. anisopliae</i>	41
3.3.6.3. Formulações com <i>B. bassiana</i> (primeira fase)	43
3.3.6.4. Experimentos com as formulações de <i>B. bassiana</i>	44
3.3.6.5. Formulações com conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> (segunda fase)	46
3.3.6.6. Experimento com as formulações de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> (segunda fase)	47
3.3.7. Produção de micélios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em meio líquido	52
3.3.8. Preparação de amido pregelatinizado .	53
3.3.9. Formulações com micélios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>	54
3.3.10. Experimentos com as formulações de micélios dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em condições de laboratório e campo	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Produção de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>	61
4.2. Compatibilidade dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> com agentes molhantes e emulsificantes	62
4.3. Viabilidade dos conídios de <i>M. anisopliae</i> nas formulações preparadas na primeira fase da pesquisa	64

4.4. Viabilidade de conídios de <i>B. bassiana</i> nas formulações preparadas na primeira fase da pesquisa	69
4.5. Viabilidade dos conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> nas formulações com óleos na segunda fase da pesquisa	76
4.6. Patogenicidade de conídios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> formulados em óleos, para <i>D. saccharalis</i> em laboratório	85
4.7. Viabilidade dos conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis na segunda fase da pesquisa	89
4.8. Patogenicidade de formulações pós molháveis com conídios de <i>M. anisopliae</i> para <i>D. saccharalis</i> em laboratório	98
4.9. Viabilidade dos conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis na segunda fase da pesquisa	102
4.10. Patogenicidade de formulações pós molháveis com conídios de <i>B. bassiana</i> para <i>D. saccharalis</i> em laboratório	111
4.11. Correlação entre a viabilidade de conídios de <i>B. bassiana</i> e a mortalidade de lagartas de <i>D. saccharalis</i>	115
4.12. Formulações com micélios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>	116
5. CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
1	Relação de agentes molhantes e emulsificantes testados	37
2	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> misturados com diferentes agentes molhantes e emulsificantes. Temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas	63
3	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis com dextrose. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas	65
4	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis com maltose. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas	67
5	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis com leite em pó. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas	68
6	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis com mel. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas	69

7	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis com dextrose. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	70
8	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis com maltose. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	72
9	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis com lactose. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	73
10	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis com mel. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	74
11	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em óleos. Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	77
12	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em óleos. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	80
13	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em óleos. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	81

14	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a diferentes formulações de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> em óleos após as preparações. Temperatura de incubação $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	86
15	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a formulações de <i>B. bassiana</i> em óleo de girassol após 5 meses de armazenamento. Temperatura de incubação $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase.....	87
16	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a formulações de <i>B. bassiana</i> em óleo de girassol após 8 meses de armazenamento. Temperatura de incubação $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	88
17	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $20\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	90
18	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	94
19	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $30\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	96

20	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de <i>M. anisopliae</i> , após a preparação Temperatura de incubação $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	99
21	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de <i>M. anisopliae</i> , após 5 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Temperatura de incubação $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	100
22	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de <i>M. anisopliae</i> , após 8 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Temperatura de incubação $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	101
23	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas .	103
24	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas .	107
25	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas .	108

TABELA Nº

Página

26	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de <i>B. bassiana</i> , após a preparação. Temperatura de incubação $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	112
27	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de <i>B. bassiana</i> , após 5 meses de armazenamento a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Temperatura de incubação de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	114
28	Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de <i>B. bassiana</i> , após 8 meses de armazenamento a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Temperatura de incubação de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	115
29	Número médio de conídios $\times 10^7$ produzidos por $23,75\text{ mm}^2$ de superfície de grânulos obtidos de formulações com micélios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> . Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	117
30	Número médio de conídios $\times 10^7$ produzidos por $23,75\text{ mm}^2$ de superfície de grânulos obtidos de formulações com micélios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> . Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	119

TABELA Nº.

Página

31	Número médio de conídios $\times 10^7$ produzidos por 23,75 mm ² de superfície de grânulos obtidos de formulações com micélios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> . Temperatura de $35\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas	119
32	Esporulação, germinação e perdas de partículas de micélios de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> em cana-de-açúcar e no solo. Temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas (Piracicaba, 1993)	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
1	Localização de partículas de micélios secos puros e formulados com <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> , colocados no solo, axilas e bainhas foliares de cana-de-açúcar. Piracicaba, 1993.....	60
2	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em óleos. Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	78
3	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em óleos. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	82
4	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> em óleos. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	82
5	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> formulado em óleos aos 90 dias de armazenamento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	83
6	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> formulado em óleo de girassol. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	83

7	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	91
8	Viabilidades médias (%) de conídios puros de <i>M. anisopliae</i> . Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	92
9	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> formulado com lactose mais syloid. Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase	92
10	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	95
11	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis aos 90 dias de armazenamento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	95
12	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>M. anisopliae</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	97

13	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	104
14	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> formulado com lactose mais syloid. Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	105
15	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> . Temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	105
16	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas .	109
17	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis aos 90 dias de armazenamento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas	109
18	Viabilidades médias (%) de conídios de <i>B. bassiana</i> em formulações pós molháveis. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas .	110

EFEITO DE FORMULAÇÕES NA PRESERVAÇÃO DE
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.
e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Autor: Edmilson Jacinto Marques

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

RESUMO

Este estudo visou a elaboração de formulações experimentais com conídios e micélios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Procurou-se identificar diluentes e adjuvantes que favorecessem a preservação desses propágulos com objetivo de obter uma formulação estável sob a temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Patologia de Insetos e campo experimental do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP. As formulações pós-molháveis com conídios foram preparadas com caulim, filito, diatomito, syloid, amido de milho e amido de arroz, utilizando-se como adjuvantes, dextrose, maltose, leite em pó, lactose e mel de abelha. As formulações em óleos foram elaboradas com óleo de girassol e óleo mineral não emulsionável (OPA-Petrobrás). Os micélios foram formulados com alginato de sódio e amido de milho pregelatinizado. As formulações com conídios foram submetidas às temperaturas de

20±1°C, 25±1°C e 30±1°C e as formulações com micélios, em 25±1°C, 30±1°C e 35±1°C. A patogenicidade dos conídios formulados foi avaliada em lagartas de *Diatraea saccharalis*. Após 180 dias de armazenamento sob a temperatura de 20±1°C, os conídios de *M. anisopliae* mais lactose apresentavam-se com 70% de viabilidade. Com relação a *B. bassiana*, os tratamentos conídios puros e conídios mais meio de cultura (arroz) mantiveram-se com 95% de viabilidade, enquanto que os conídios da formulação com lactose mais syloid tiveram a viabilidade reduzida para 60%. Com o óleo de girassol, *B. bassiana* manteve-se com 90% de viabilidade após 240 dias de armazenamento. O amido de milho pregelatinizado foi mais adequado que o alginato de sódio para elaboração de formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

EFFECTS OF FORMULATIONS ON THE PRESERVATION
OF *Beauveria bassiana* (Bals.). Vuill. AND
Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. UNDER
DIFFERENT STORAGE CONDITIONS

Author: Edmilson Jacinto Marques

Adviser: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

SUMMARY

This research deals with the preparation of experimental formulations with conidia and mycelia of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. The experiments were set in the Laboratory of Insect Pathology and in the experimental field of the Department of Entomology, "Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz", in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil. The wettable powder formulations with conidia were prepared with inert materials (kaolin, phyllite, diatomite, syloid, corn-starch and rice-starch) and adjuvants (dextrose, maltose, milk powder, lactose and honeybee). The oil formulations were prepared with sunflower oil and non-emulsifiable mineral oil (GPA-Petrobrás). The mycelia were prepared with sodium alginate and pregelatinated corn-starch. The formulations with conidia were kept at 20, 25 and $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and the formulations with mycelia were kept at 25, 30 and $35 \pm 1^\circ\text{C}$. The pathogenicity of the conidia formulations was evaluated on

larvae of *Diatraea saccharalis*. *M. anisopliae* conidia plus lactose present 70% of viability after 180 days of storage at $20\pm1^{\circ}\text{C}$. *B. bassiana* pure conidia and conidia plus culture media (rice) presented 95% of viability while conidia with lactose plus syloid presented 60% of viability. *B. bassiana* with sunflower oil presented 90% of viability after 240 days of storage. Pregelatinated corn-starch was more suitable than the sodium alginate for the preparation of formulations with mycelia of *B. bassiana* and *M. anisopliae*.

1. INTRODUÇÃO

O controle microbiano destaca-se como um dos métodos mais promissores de controle de pragas em várias culturas.

Dentre os agentes de controle biológico de insetos, os fungos distinguem-se pela abundância de gêneros e espécies no controle de pragas de importância econômica (VEEN, 1968; ALVES, 1986 e 1992; ZIMMERMANN, 1982).

No Brasil, a exemplo de outras regiões do globo, os fungos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* vêm sendo os mais estudados e utilizados devido a sua ampla faixa de ação e facilidade de produção em condições de laboratório.

Em 1969, iniciou-se no Estado de Pernambuco, um programa de controle da cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata*, com ênfase na utilização do fungo *Metarhizium anisopliae*. Esse patógeno era produzido em arroz e armazenado em sacos de plástico em câmara frigorífica, à temperatura de 2 a 5°C.

No período de 1970 a 1991 foram produzidos em Pernambuco aproximadamente 38.000 kg de conídios de *M. anisopliae*, os quais foram utilizados para pulverização de 474.000 hectares de canaviais infestados pela cigarrinha *M. posticata* (MARQUES, 1992). Durante esse programa, geralmente o fungo era produzido e utilizado em um período de três meses, chegando algumas vezes a 6 meses de armazenagem nas condições anteriormente referidas.

No entanto, observou-se que parte desse material perdia a viabilidade após alguns meses de armazenamento, provavelmente devido ao excesso de umidade contida no fungo.

Com relação ao fungo *B. bassiana*, este vem sendo empregado no controle de pragas como o moleque-da-bananeira *Cosmopolite sordidus*, cupim de montículo *Cornitermes cumulans* e a broca dos citros *Diploschema rotundicolle*, sendo também o seu potencial avaliado em diversos laboratórios para o controle de outras pragas (ALVES, 1992).

B. bassiana também é facilmente produzido quando fermentado em meio líquido ou em meio semi-sólido de arroz cozido, podendo-se obter considerável volume de conídios por um custo relativamente baixo. Mais recentemente, tem sido enfatizada a produção desses fungos em forma de micélio seco.

Apesar da eficiência comprovada dos referidos entomopatógenos, a escassez de formulações ou preparações que permitam suas preservações em temperatura ambiente por um período de tempo razoável, apresenta-se como um dos principais obstáculos para utilização mais ampla desses fungos.

Assim, esta pesquisa teve como objetivo a elaboração de formulações com conídios e micélios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Procurou-se identificar possíveis diluentes e adjuvantes que favorecessem a preservação desses propágulos, visando a obtenção de uma formulação estável sob a temperatura de $\pm 20^{\circ}\text{C}$.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em pesquisas com formulações de agentes microbianos, a temperatura, a umidade e o substrato, dentre outros são os fatores, mais importantes para a manutenção da viabilidade e atividade biológica dos organismos estudados.

2.1. Produção e formulação de conídios

Com relação a influência da temperatura, umidade, concentração de gás carbônico e luminosidade sobre a estabilidade dos conídios de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces farinosus*, verificou-se que a viabilidade dos conídios foi reduzida pela exposição a luz e elevação de temperatura. Os conídios de *B. bassiana* e *P. farinosus*, perderam a capacidade de germinação mais rapidamente nas umidades mais elevadas, enquanto que *M. anisopliae* sobreviveu durante mais tempo em umidades extremas. Quando os conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e

P. farinosus foram mantidos no escuro a 8°C e 0% de umidade relativa, observou-se uma germinação próxima a 90% dos referidos fungos, após 28, 635 e 140 dias respectivamente. *M. anisopliae* apresentou 92% de conídios germinados após 252 dias quando mantidos no escuro a 8°C e 75% de umidade relativa. A retirada de oxigênio eliminou o efeito desfavorável de umidades relativas intermediárias para a viabilidade de conídios de *M. anisopliae* (CLERK & MADELIN, 1965).

KAWAKAMI & MIKUNI (1965) trabalhando com os fungos *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa* no Japão, verificaram que, com o aumento da temperatura, houve uma redução na longevidade dos esporos e que a viabilidade foi mais alta em baixa umidade relativa. Os autores observaram ainda que, ao redor de 80% de umidade relativa (UR), a viabilidade dos esporos foi baixa e esse comportamento foi mais acentuado em temperaturas elevadas. Após 50 dias a viabilidade dos conídios em meio de cultura foi 36,7% para *I. fumosorosea* e 59,9% para *I. farinosa*, constatando-se que aos 115 dias, os fungos tornaram-se inviáveis. Os autores apresentaram ainda as porcentagens de germinação dos fungos a 0, 10, 20 e 30°C, expostos a umidade relativa de 0 a 87%.

WALSTAD et al. (1970) estudaram os principais fatores ambientais que afetam a eficiência de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* como agentes de controle biológico de *Hylobius pales* e verificaram que a 21°C,

B. bassiana perdia a viabilidade dos conídios aos 15 dias, enquanto que *M. anisopliae* perdia a viabilidade aos 75 dias. Entretanto, quando armazenados a 8°C, ambos permaneceram viáveis após 12 meses.

ZIMMERMANN (1982) verificou uma correlação entre as condições de umidade presentes e a resistência dos conídios de *Metarhizium anisopliae* ao calor. A temperatura média letal foi de 42°C para exposição de uma suspensão aquosa por 30 minutos e de 50,5; 57 e 68,8°C, respectivamente para os conídios em pó submetidos as umidades de 100, 76 e 33%. O autor constatou ainda que, após 30 minutos de aquecimento da suspensão a 45°C, apenas 6,2% dos conídios germinaram com 24 horas de incubação. Decorridas 48 horas, a germinação totalizou 81,8%, e após esse período, não foi possível constatar outras determinações, uma vez que as placas estavam totalmente cobertas pelo fungo.

ABREU et al. (1983) trabalhando com *Metarhizium anisopliae*, verificaram que temperaturas de 25-28°C propiciaram perdas na viabilidade de conídios aos 120 dias de armazenamento e redução da patogenicidade para *Galleria* e *Decis*. O armazenamento em congelador a -13°C apresentou melhores condições para preservação e viabilidade dos conídios. Em trabalho semelhante realizado com *Beauveria bassiana*, constatou-se também que, para esse fungo, o armazenamento em freezer (-13°C) manteve a viabilidade dos conídios durante os 10 meses do experimento, enquanto que a

5°C houve queda acentuada de viabilidade após seis meses (BATISTA FILHO & CARDELLI, 1986).

A moagem, peneiramento e armazenamento de *Metarhizium anisopliae* à temperatura de 26-30°C, provocaram a rápida deterioração dos conídios, como também favoreceram a contaminação por *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp.. Conclui-se, desse modo, que a manipulação e armazenamento de conídios puros, influenciaram negativamente no seu poder germinativo (BASTOS CRUZ et al., 1985).

O desenvolvimento de uma formulação de inseticida microbiano apresenta semelhanças com o processo de formulação de inseticidas químicos tendo em vista razões técnicas e econômicas. O objetivo do formulador é evitar práticas que possam inibir ou prejudicar o patógeno e, sempre que possível, aumentar a possibilidade de infecção. Os inertes e condutores usados em formulações incluem compostos como attapulgita, greda, pirofilita, talco, caolim, bentonita dentre outros. A ação abrasiva de alguns grupos de pós aumenta a suscetibilidade de alguns insetos para infecção de fungos. Alguns cuidados devem ser tomados para se evitar o aumento de temperatura ou danos físicos quando materiais contendo patógenos são misturados e moídos para a obtenção de pós finos. Muitos aditivos já foram utilizados em formulações, entre os quais leite em pó, caseína, lactose, melaço, mel, óleo, Tween[®] etc. Considerando-se que alguns patógenos de insetos são altamente suscetíveis a perdas pela

exposição a luz solar e radiação ultra-violeta, os autores sugerem a encapsulação para minimizar tais efeitos (ANGUS & LUTHY, 1971).

ROBERTS & CAMPBELL (1977) revisando a estabilidade dos fungos entomopatógenos, mencionaram o efeito de vários fatores do ambiente sobre o crescimento e sobrevivência dos fungos. A presença de luz foi prejudicial a sobrevivência dos conídios, porém o efeito sobre os demais estágios foi variável. A temperatura elevada produziu mortalidade no estágio vegetativo de fungos entomopatogênicos, mas os conídios foram mais resistentes ao calor. Entretanto, sob baixa temperatura, a viabilidade dos conídios foi sendo perdida mais lentamente. Diferenças na estabilidade em função de solo, água e hospedeiro também foram discutidas. A umidade elevada foi essencial para germinação dos conídios, embora o efeito sobre o desenvolvimento da doença não tenha sido conclusivo. Finalmente os autores apresentam a influência de vários produtos químicos sobre os entomopatógenos.

FARQUES et al. (1979) trabalhando com *Beauveria*, elaboraram formulações considerando a estabilização dos propágulos infectivos através da desidratação e envolvimento com argila. Conforme a metodologia de produção, dois processos de secagem foram empregados. O primeiro foi efetuado através de uma corrente de ar a 150°C para os conídios de *Beauveria brongniartii*

envolvidos na bentonita, determinando um rendimento de 50 a 70% de conídios viáveis. Por outro lado, os blastosporos de *Beauveria bassiana* muito sensíveis a esta técnica, foram desidratados em bandejas vibratórias com leite em pó suplementado com glicerina, tendo 89% de rendimento. A conservação a 5°C não afetou o potencial de inóculo dos conídios após 18 meses nem os blastosporos até oito meses de observação. Os bioensaios sobre larvas de *Leptinotarsa decemlineata* e *Plutella maculipennis*, confirmaram a necessidade do armazenamento dessas biopreparações a 5°C.

FERRON (1978) refere-se a preparação experimental de *Beauveria bassiana* padronizada na Rússia, denominada Beauverin ou Boverin, contendo 2×10^9 conídios/g e caulim como inerte. O controle de qualidade dessa preparação abrange contagem de conídios, a estimativa de germinação e os estudos sobre virulência.

McCOY & COUCH (1978) mencionaram que, as preparações de fungos entomopatogênicos utilizados em campo, são frequentemente caracterizadas pela ausência de padronização. O método de contagem de conídios padronização mostra-se inadequado, visto que a perda de viabilidade nem sempre indica mudança na virulência. Desta forma, enfatizaram o desenvolvimento de técnicas de bioensaio usando hospedeiros alternativos para testes. Os autores mencionaram ainda que, formulações comerciais de *Hirsutella thompsonii* expostas a umidade ambiental e temperatura de

25°C, perderam 99% da viabilidade dos conídios em 6 meses. Uma formulação pó seco (2% de conídios viáveis) e duas formulações pós molháveis (10⁸ conídios/g), foram avaliadas para o controle de ácaros em citros na Flórida.

COUCH & IGNOFFO (1981) discutiram a formulação de patógenos de insetos e afirmaram que a combinação de um biocida ativo com um segundo material é tecnicamente considerado uma formulação. Para o seu desenvolvimento são necessárias pesquisas da viabilidade e virulência do patógeno durante o processo de produção e desenvolvimento do produto. Sugeriram a refrigeração para garantir uma conservação adequada, principalmente para preparações com elevado teor de umidade. Uma vez preparado e estabilizado para preservar suas características desejáveis, o patógeno pode ser formulado em pó seco, pó molhável, grânulos, iscas, suspensão aquosa emulsionável e suspensão não aquosa emulsificável, fazendo-se necessários experimentos com óleos, emulsificantes, preservantes e diluentes. Devido as suas similaridades, a maioria dos agentes molhantes, adesivos e dispersantes comerciais são compatíveis com *Bacillus thuringiensis* e vírus. No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre protozoários e fungos. Com relação a estabilidade, o inseticida microbiano deve permanecer pelo menos 18 meses, quando armazenado em condições ambientais. Excluem-se dessa exigência, aquelas formulações fornecidas por contrato para aplicação em data específica, para as quais são considerados

3 a 6 meses de conservação. Em geral, exceto para *B. thuringiensis*, *Hirsutella thompsonii* e NPV *Heliothis*, pouco é conhecido a respeito da conservação de formulações para uso em larga escala na agricultura. Amostras da preparação comercial de *H. thompsonii* (Micar) mantidas a 4°C não apresentaram perdas após um ano.

Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são usualmente produzidos sobre meio semi-sólido, com exceção da produção de *B. bassiana* em fermentação líquida na Rússia. A maioria das formulações experimentais de micoinseticidas não vão além de 6 meses de conservação em temperatura ambiente, incluindo *Boverin*, *Verticillium* e *Entomophthorales*. Considerando que doenças ocasionadas por fungos geralmente ocorrem tarde em relação ao ciclo da praga, a estratégia usada para o controle de insetos com esses organismos deveria ser através da antecipação da epizootia pela introdução de uma fonte de inóculo volumosa. A seleção de raças, através de manipulação genética provavelmente proporcionará importantes avanços no uso de fungos entomopatogênicos. Do mesmo modo, o desenvolvimento da produção e formulação, terá um impacto significativo sobre a confiança nesses agentes de controle de insetos (SOPER & WARD, 1981).

DAOUST et al. (1982) trabalhando com formulações granuladas e pós do fungo *Metarhizium anisopliae*, verificaram que a virulência das preparações foram reduzidas

significativamente - em relação aos conídios não formulados, quando estas foram armazenadas a 4 e 20°C durante 8 e 12 meses. Os componentes de formulação mais prejudiciais aos conídios foram sabugo de milho, diatomáceo e dois diluentes provenientes de caulim. Os valores de TL_{50} foram aumentados de 2,5 para mais de 6 dias. Em contraposição, uma das formulações em pó, tendo como diluente um derivado de óleo de ricino seco (Trixcin R), aumentou significativamente a virulência desses conídios. As diferenças na viabilidade dos conídios não foram relacionadas com a virulência. Esses resultados demonstram a necessidade da realização de bioensaios com as formulações para verificação da atividade biológica, antes da aplicação dos produtos no campo.

DAOUST & ROBERTS (1983a) estudando conídios de 3 raças de *Metarhizium anisopliae* em quatro temperaturas (37, 26, 19 e 4°C) e seis umidades relativas (0, 12, 33, 53, 75 e 97%) durante dois anos, verificaram uma maior sobrevivência de conídios em temperaturas moderadamente altas, 19 e 26°C para UR de 97%) e à baixa temperatura (4°C para UR de 0%). quando aproximadamente 80% dos conídios germinaram após 8 meses de armazenamento. Valores intermediários de UR entre 33 e 75%, dependendo da raça do fungo, foram mais letais, especialmente a 19 ou 26°C. Quando a temperatura foi reduzida de 37 para 4°C a longevidade dos conídios foi aumentada em quase todos os valores de UR. Os conídios permaneceram virulentos em condições favoráveis de armazenamento, pelo

menos 18 meses contra larvas de *Culex pipiens pipiens* e 12 meses contra *Anopheles stephensi*.

As melhores condições para armazenamento dos conídios de *Metarhizium anisopliae* para manutenção de viabilidade e virulência foi 19°C a 97% RH e 4°C a 0% UR. As condições de crescimento e substrato também afetaram a viabilidade e virulência do fungo antes e após o armazenamento. A viabilidade foi consistentemente mais alta para conídios crescidos em arroz do que aqueles produzidos em meios micológicos complexos, para todas as temperaturas e condições testadas (DAOUST & ROBERTS, 1983b).

DAOUST et al. (1983) estudaram os efeitos de formulações de *M. anisopliae* em óleos minerais e vegetais, veículos aquosos, não aquosos, granulados e pós, sobre a viabilidade dos conídios armazenados durante o período de 12 meses em diferentes temperaturas. Verificaram que as formulações aquosas e óleos reduziram a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* após 2 meses de armazenagem a 17 e 26°C. Outros veículos líquidos, incluindo óleos minerais, ácidos orgânicos e água, com e sem surfatante, também foram altamente letais aos conídios após 4 meses de armazenagem, a 4 e a 20°C. Ao contrário das formulações líquidas, na maioria das formulações granuladas e pós, a viabilidade conidial permaneceu alta por um período de 12 meses a 4°C. Entretanto, a 20°C a viabilidade decresceu para 80% após seis meses e menos de 50% após 12 meses na maioria das formulações pós.

ALVES et al. (1987) estudaram a viabilidade de 64 formulações de conídios de *Metarhizium anisopliae* armazenados em temperatura ambiente, refrigerador e freezer. Foram utilizados os seguintes diluentes e adjuvantes: talco, sílica gel, pirofilita OB-MBY, filito OB-YB, caulim, bentonita, ácido bórico LE-36SMO e farinha de arroz. As formulações 14 (50% fungo, 50% de filito), 18 (50% fungo, 50% farinha de arroz) e 27 (50% fungo, 50% farinha de arroz, 0,10g de ácido bórico) apresentaram em torno de 80% de viabilidade dos conídios após 270 dias, enquanto que o fungo não formulado perdeu a viabilidade em menos de 210 dias. em condições ambiente. No refrigerador, algumas formulações mantiveram viabilidade de mais ou menos 70%, até aos 510 dias, enquanto que o fungo puro perdeu a viabilidade aos 420 dias. Em freezer, o fungo puro perdeu a viabilidade aos 420 dias, enquanto que o fungo formulado permaneceu com 70% de viabilidade até 660 dias.

Quilan¹, citado por PEREIRA (1987) faz restrições ao desenvolvimento de formulações com fungos entomopatogênicos, em função do alto custo, da alta especificidade para pragas, do curto período de conservação,

¹ QUILAN, R.J., 1986. Biotechnology - the last hope for entomopatogenic fungi. In: Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. R.A. Samson, J.M. Vlak & D. Peters, eds. Foundation of the Fourth International Colloquium of Intertebrate Pathology, pp. 607-610.

da elevada dependência das condições climáticas na hora de aplicação e da mortalidade lenta dos insetos. Reportando ainda que formulações de fungos entomopatogênicos, devido a sua baixa estabilidade, têm demonstrado ser mais difícil para obtenção do que formulações de outros agentes de controle microbiano, concluindo que ainda não chegou a hora dos fungos entomopatogênicos.

LATGÉ & MOLETTA (1988) mencionaram que existem poucas informações sobre formulações de fungos entomopatogênicos porque a tecnologia permanece ainda como segredo industrial. No entanto, sabe-se que se trata de uma mistura de vários produtos compatíveis que incluem: um ingrediente ativo, tipicamente conídios; um diluente e ou um dispersante; um agente molhante e um adesivo. Existem três tipos de formulações secas: pós, composta de 10% de conídios e 90% de argila fina (partícula com 40 μ m de tamanho) como diluente; grânulos, feito com o ingrediente ativo (5 a 20%), um veículo (80 a 95%) e um aglutinante (1-5%); pó molhável, consistindo de alta concentração de ingrediente ativo (50 a 80%), um enchimento como argila (15 a 45%), um dispersante (1 a 5%), um surfatante (3 a 5%) e um veículo como água ou óleo (35 a 65%).

A capacidade de sobrevivência dos conídios de deuteromicetos é diretamente influenciada pelo conteúdo de umidade, sendo que uma desidratação lenta é favorável para a conservação dos conídios. As condições de baixas temperaturas

(4-5°C), embora antieconômicas, são necessárias para aumentar o tempo de armazenagem. Nessas condições, conídios de *Verticillium leucanii*, *H. thompsonii* e *Conidiobolus obscurus*, permaneceram viáveis pelo menos por 12 meses. Em temperatura ambiente, a maioria dos fungos perdem rapidamente a viabilidade, frequentemente em menos de um mês (Latgé & Perry²; Lisansky & Hall³, citados por LATGÉ & MOLETTA, 1988).

McCOY et al. (1988) em ampla revisão sobre fungos entomopatogênicos, mencionaram que, ao contrário dos pesticidas químicos, micélios, conídios, esporos de resistência, blastosporos, zoosporos e esporângios, produzidos pelas várias espécies de fungos, são propágulos vivos, tornando-se crítica a escolha de aditivos para uma dada formulação em relação a sua estabilidade. Salientam que o objetivo do formulador é maximizar a estabilidade da unidade infectiva, para que seja intensificada a infecção do hospedeiro após a aplicação do patógeno no campo. Os conídios geralmente são formulados como pó seco ou pó molhável. Considerando a rápida germinação de conídios é

² LATGÉ, J.P. & PERRY, D.F., 1980. Perfectionnements apportés aux procédés de preparation de spores durables d'Entomophthorales pathogènes d'insectes, préparation des spores ainsi obtenues et compositions phytosanitaires contenant les dites préparations. French Patent 80 24 769 (11.21.1980).

³ LISANSKY, S.G. & HALL, R.A., 1983. Fungal control of insects. In: The Filamentous Fungi. Vol. 4. Fungal Technology (Eds. J.E. Smith, D.R. Herry & B. Kristiansen). Edward Arnold Publ., London, pp. 337-345.

preferível usar um pó para formulação. Talco, farinha de cereais e leite em pó têm servido como diluentes para pós. Formulações líquidas, geralmente não são aceitáveis para preparações conidiais e blastosporos. FARGUES et al (1983) demonstraram que uma cobertura de argila prolongou a viabilidade de blastosporos de *Beauveria bassiana* no solo.

Estudos conduzidos com duas formulações comerciais de *B. bassiana*, uma na forma de pó molhável (ABG 6112) e outra granular (1.10^7 conídios/g, ID 16297-165), comparando a penetração e persistência no solo em dois sistemas de cultivo, verificaram que o número de UFCs (Unidades formadoras de colônias) recuperado em parcelas tratadas com formulação granular foi 10 vezes maior do que o número recuperado em parcelas tratadas com suspensão aquosa. Após 202 dias, 111 UFCs viáveis/cm² de solo seco permaneciam em parcelas tratadas com formulação granular (STOREY et al., 1989).

KYBAL & KALALOVA (1990) referem-se à introdução da tecnologia de produção do inseticida microbiano Boverol na Checoslováquia, tendo *B. bassiana* como princípio ativo. Trata-se de um pó insolúvel em água que foi aplicado como suspensão, isolado ou em combinação com inseticidas selecionados e agentes molhantes. O produto deve conter pelo menos 10^{10} conídios/g e 70% de viabilidade, podendo ser armazenado até a temperatura de 10°C por 12 meses.

A formulação Boverol foi armazenada na temperatura de a 4 a 10°C por um período de 8 anos conseguindo-se manter a atividade biológica acima de 50% no final desse período. Aos 5 anos de armazenagem, a formulação apresentava mais de 80% de viabilidade com atividade biológica acima de 70% (STARCOVÁ & WEISER, 1992).

ZHANG et al. (1990) formularam *Beauveria bassiana* em 3 diferentes preparações, sendo uma pó molhável, uma pó solúvel e a última granular, para distribuição manual. Estudos de campo mostraram que não houve diferença significativa na eficiência das três formulações contra *Ostrinia furnacalis*. A preparação em pó molhável no entanto foi mais econômica e mais fácil para transportar e armazenar em relação as demais.

HUANG et al. (1990) trabalhando com pragas de florestas na China, utilizaram preparações de conídios de *Beauveria bassiana* com melaço de cana-de-açúcar e amido de batata doce, formando uma preparação pastosa. Quando a pasta foi colocada no orifício feito por *Zeuzera multistrigata*, resultou em 88,5 a 98,4% de mortalidade do inseto, e permanecendo o produto com infectividade após 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

AREGGER. (1992) produziu raças de *Beauveria brongniartii* sobre grãos de cevada. O rendimento de conídios respondeu favoravelmente à adição de água e ao aumento do período de incubação. Após 24 meses de armazenamento a 2°C, o

número de conídios viáveis decresceu devido à germinação e à perda natural de viabilidade.

ZHANG et al. (1992) testando em laboratório agentes molhantes e aditivos para utilização em conídios puros de *B. bassiana*, obtiveram duas formulações, as quais formaram uma suspensão uniforme em 3 minutos, com 89% das partículas passando através de 325 mesh, uma percentagem de germinação acima de 85% e estabilidade de 8 meses a 10-20°C, mantendo viabilidade de 85%. Entretanto estas propriedades não foram significativamente diferentes daquelas obtidas com os conídios puros em pó. A formulação contendo 50×10^7 conídios/g matou 95% de indivíduos de *Ostrinia furnacalis* em laboratório com uma CL_{50} de 7.3×10^5 conídios/ml e um TL_{50} de 4,7 dias.

ALVES (1992) menciona que apesar de existirem alguns estudos sobre formulações de fungos, pouco tem sido realizado nesta área e os produtos existentes no comércio nunca chegam a ser preservados por mais de oito semanas. Refere-se ainda que, em pesquisas dessa natureza, a avaliação da viabilidade dos propágulos e a avaliação da virulência das formulações tornam-se fundamentais após o período de armazenamento.

PRIOR & JOLLANDS (1988) utilizaram *Beauveria bassiana* formulado em óleo de côco e água para infectar adultos de *Pantorhytes plutis* em Nova Guiné. A LD_{50} das formulações em óleo e água mais 0,01% de Tween-80[®] foi

$1,18 \times 10^3$ e $4,29 \times 10^4$ respectivamente, e a suspensão em óleo permaneceu infectiva quando aplicada em ultra baixo volume, podendo ser armazenada por 40 dias em refrigerador.

Os fungos *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. têm o melhor potencial para o desenvolvimento como micopesticidas, ainda que apresentem vários problemas a serem resolvidos. Formulações para pulverização em ultra baixo volume são essenciais, principalmente para aplicações aéreas em condições áridas. Formulações de *Beauveria* baseadas em óleo tem uma LD₅₀ mais baixa do que a formulação com água, provavelmente porque óleos são cutinofílicos e distribuem o inóculo sobre a superfície do inseto. A germinação do conídio sobre a superfície do inseto, ao que tudo indica, requer alta umidade relativa, mas pode ser facilitada pelas formulações a base de óleo, as quais permitem que o inóculo alcance as partes mais úmidas do integumento (PRIOR et al., 1990).

O fungo *Beauveria bassiana* misturado com óleo de soja proporcionou praticamente 100% de controle do gorgulho aquático do arroz em áreas irrigadas (LEITE et al., 1992).

McCOY et al. (1992) compararam uma formulação de conídios de *B. bassiana* em óleo mineral com outras formulações granulares de micélios e conídios, verificando que todas as preparações foram altamente virulentas para larvas do gorgulho das raízes de citros na Flórida, com TL₅₀ ao redor de 6 dias na dosagem de 1×10^7 c/cc de solo.

BATEMAN (1992a,b) mencionou que os fungos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, têm parede celular lipofílica, portanto são mais fáceis para preparações com óleos do que com suspensões convencionais em água. Essa propriedade, aliada a necessidade da utilização dos referidos fungos em ambiente seco, levou o autor a efetuar formulações de *Metarhizium flavoviride* com óleo, para pulverização em baixo volume. A suspensão em óleo teve uma ação mais rápida do que em água contra adultos de *Schistocerca gregaria*, matando os insetos em 5 dias a 30°C e 35% UR em laboratório. Os resultados mostraram que essa técnica foi promissora, indicando que problemas com produção de conídios e estabilidade das formulações podem ser resolvidos.

MOLAN (1992) apresentou uma revisão sobre a atividade antimicrobiana do mel de abelha, onde é verificada a concentração mínima inibitória para cada mel estudado. As maiores diferenças encontradas sobre a sensibilidade de cada espécie de microorganismo, é devido provavelmente a origem do mel utilizado. O autor menciona que o mel é uma solução saturada de açúcares, contendo apenas 15 a 21% do peso em água, sendo que 84% dos sólidos do mel constituem uma mistura dos monossacarídeos frutose e glucose. A interação das moléculas de açúcar com moléculas de água deixam poucas moléculas de água disponíveis para os microorganismos. Essa água livre é medida como atividade de água. Os fungos geralmente são mais tolerantes a baixa atividade de água do

que as bactérias. Desta forma, as informações da atividade antifúngica do mel diluído, indicam que existem outros fatores envolvidos nessa atividade além do açúcar do mel. A completa inibição de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium chrysogenum* foi observado com 75% do mel natural, entretanto, obteve-se apenas inibição parcial desses microrganismos quando foi utilizado mel artificial na mesma concentração. Algumas espécies de bactérias com pouca tolerância a baixa atividade de água (aw) provavelmente é inibida por baixa concentração de mel, independentemente de outros fatores. Resultados de experimentos indicam que, além do efeito osmótico, existem atividades adicionais antibactericidas ao mel. Essa atividade antibactericida pode ser também proveniente do peróxido de hidrogênio produzido pela ação enzimática do mel ou ainda pelas substâncias antibactericidas da planta que deu origem ao mel.

MOORE et al. (1993) formularam conídios de *Metarhizium flavoviride* em óleo mineral e vegetal para utilização em áreas com baixa umidade relativa contra *Schistocerca gregaria*. Os experimentos conduzidos pelos autores, mostraram que os conídios permaneceram viáveis e virulentos durante 18 meses em mistura de óleos mineral e vegetal armazenados a 8 e 17°C. Entretanto, formulações produzidas e armazenadas na África perderam mais rapidamente viabilidade no período de 2 a 3 meses. Essa perda foi atribuída ao sistema de produção do fungo que mantém mais de

40% de umidade nos conídios, fazendo-se necessário a redução para abaixo de 10% antes da adição dos óleos. Se os conídios são secos com ar, deixando a umidade entre 5 e 10%, ficam mais tolerantes a armazenagem em temperaturas elevadas (26-30°C), porém é aconselhável a manutenção da temperatura abaixo de 20°C e preferencialmente abaixo de 10°C. Os óleos minerais diesel, querosene, querosene deionizado e óleos vegetais como os de soja e amendoim, parecem satisfatórios para armazenagem do fungo.

McCLATCHIE et al. (1993) verificaram que a tolerância de *Metarhizium flavoviride* a temperaturas, formulados em óleo, é altamente incrementada pela secagem antes da mistura; conídios úmidos mostraram redução na viabilidade após 8 horas de exposição a 45°C, enquanto que conídios secos, com a adição de sílica gel, toleraram pelo menos 7 dias com uma perda mínima de viabilidade. Cinco horas de exposição a 60, 70 e 80°C resultaram em percentagens de germinação de 80, 50 e 10%, respectivamente. A tolerância dos conídios foi comprovada pela exposição a 55°C durante 7 dias com redução apenas de 10% na viabilidade. Conídios produzidos a 30°C mostraram maior tolerância para temperaturas elevadas do que aqueles produzidos a 26°C e essa tolerância foi também alterada pelo ajuste de nutrientes no meio de cultura. O trabalho demonstrou que a formulação de conídios em óleo pode suportar pequenos períodos (7 dias) de temperaturas extremas para adequação a situação de campo, mantendo boa viabilidade.

2.2. Produção e formulação de micélios

McCOY et al. (1975) efetuaram a produção de micélio de *Hirsutella thompsonii* em meio líquido contendo dextrose, peptona, extrato de levedura e sais minerais. Os autores mencionaram que a inclusão de melaço nas preparações do fungo, aumentou a produção de conídios e reconhecem a necessidade do desenvolvimento de métodos de armazenagem que eliminem a dependência de temperatura baixa, em função da constatação da perda de viabilidade de micélio armazenado a 10°C, após 64 dias.

ABDEL-HALIM et al. (1986) estudaram a encapsulação de conídios de *Penicillium chrysogenum* usando 6% de alginato de sódio, suspensão de conídios e uma solução 0,2M de cloreto de cálcio. As cápsulas foram destruídas pelo crescimento do fungo com liberação do micélio no meio de crescimento.

CRANSTON (1983) substituiu o agar, normalmente usado em meio microbiológico, por alginato de sódio e testou o crescimento de um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, micélios e leveduras.

FRAVEL et al. (1985) trabalhando com microrganismos antagonistas, utilizaram encapsulação de agentes de controle biológico com a mistura argila-alginato. Seis microrganismos, dos quais 5 fungos e uma bactéria, foram formulados em grânulos formados com uma suspensão de 1% de

alginato de sódio e 10% de argila com cloreto de cálcio. Todos os fungos estavam viáveis após a formação dos grânulos. Os grânulos foram secos e armazenados em condições ambiente por mais de 3 meses, apresentando maior sobrevivência os conídios nas formulações produzidas com gluconato de cálcio.

ROMBACH et al. (1986) produziram preparações com micélios de *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces liliacinus* usando 1,5% de extrato de levedura e 1,5% de melaço. Os micélios foram secos e armazenados a baixa temperatura até a preparação para aplicação no campo. Os autores consideram que o uso de formulação micelial pode simplificar a produção massal de fungos entomopatogênicos e que essas preparações poderiam ser eficientes para o controle de insetos.

Shasha et al.⁴, citados por PEREIRA (1987) estudaram vários complexos de amido para encapsulação de herbicidas com o objetivo de encontrar um substituto para o hidróxido de sódio alcalino, até então utilizado. Esse objetivo foi alcançado pelo uso de amido de milho pre-gelatinizado.

⁴ SHASHA, B.S.; TRIMNELL, D.; OTEY, F.H.. 1984. Starch-borate complexes for EPTC encapsulation. J. Appl. Polymer Sci., 29: 67-73.

PEREIRA (1987) produziu micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* utilizando meio líquido com 1% de dextrose, 1% de extrato de levedura, 0,1% de óleo de girassol e 0,05% de penicilina-streptomomicina. O autor, citando Roberts & Wraight⁵ menciona que o método para produção de micélio seco foi adaptado de outros fungos, principalmente daqueles que são difíceis de produção em meio sólido. Este método inclui a filtração do meio de cultura com separação de micélio e posterior ressuspensão dos mesmos em água. A suspensão é filtrada formando um emaranhado de micélio que é pulverizado com uma solução de açúcar a 10%, sendo em seguida incubada em temperatura ambiente por 4-5 horas e posteriormente a 4°C durante 18 horas antes da secagem. Finalmente, as preparações foram armazenadas em recipientes fechados a -20°C (ou) 4°C antes da utilização (McCABE & SOPER, 1985). O autor referido inicialmente também obteve preparações de micélios secos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, estudando a sobrevivência e capacidade de produção de conídios após misturas com alginato de sódio, amido de milho e açúcares, quando armazenados a temperaturas de 22 e 4°C.

⁵ ROBERTS, D.W. & S.P. WRAIGHT. 1986. Current status on the use of insect pathogens as biocontrol agents in agriculture: fungi. In: Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. R.A. Sanson, J.M. Vlak & D. Peters. Eds. Foundation of the Forth International Colloquium of Invertebrate Pathology. pp. 510-513.

Verificando a evidência do efeito benéfico dos tratamentos com açúcar, o autor anteriormente referido, conclui que essas formulações podem representar uma alternativa viável para a utilização dos fungos entomopatogênicos no controle de pragas, bem como para a disseminação desses fungos.

ROMBACH et al. (1988) estudaram o armazenamento de micélio seco de uma raça chinesa de *B. bassiana* nas temperaturas de -20, 5, 25 e 35°C durante o período de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 semanas. À temperatura de 5°C e 2, 4, 8 e 32 semanas a esporulação foi menor do que a inicial. Na temperatura de 25°C, o número de conídios produzidos foi significativamente menor após duas semanas, e todos os micélios estavam mortos após 8 semanas. A 35°C não houve viabilidade de micélio após uma semana. Assim, puderam concluir que o micélio seco de *B. bassiana* apenas pode ser armazenado por longo período quando submetido a uma temperatura de -15°C.

PEREIRA & ROBERTS (1990) obtiveram preparações de micélios seco de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Posteriormente, submeteram essas preparações a pulverizações com dextrose, maltose e sacarose a fim de verificarem os efeitos sobre a sobrevivência das preparações e formação de conídios, após armazenamento a temperatura de 22 e 4°C. A produção de conídios provenientes de micélios tratados e armazenados por 1,5 e 4,5 meses a 4°C, não foi significativamente diferente para nenhum dos procedimentos. As preparações de *M. anisopliae* tratadas com maltose e

sacarose, armazenadas por 1,5 mês a 4°C e depois à temperatura ambiente por 3 meses, produziram mais conídios do que as preparações pulverizadas com dextrose, água ou não pulverizadas. Quando as preparações foram submetidas a temperatura ambiente, o tratamento com maltose foi superior aos demais na preservação dos micélios, com exceção do tratamento sacarose para *M. anisopliae*. Também a dextrose ofereceu proteção para o armazenamento de *B. bassiana*. Contudo, micélios tratados com esses açúcares perderam parte da capacidade de produção de conídios após o período de três meses a 22°C. A produção de conídios para ambos os fungos armazenados a 22°C foi apenas 30% da produção em relação as mesmas preparações armazenadas a 4°C.

KNUDSEN et al. (1990) formularam micélio de *Beauveria bassiana* em grânulos de alginato de sódio com e sem adição de farelo de trigo. Após 5 meses de armazenagem à temperatura ambiente, o fungo mais esporulado foi proveniente dos grânulos com farelo, com $2,54 \times 10^6$ conídios por grânulo. Estes, colocados sobre plântulas de trigo infestadas com *Schizapis graminum*, após 9 a 15 dias, provocaram a morte de 3 a 44% de pulgões, contra 0% na testemunha.

ANDERSCH et al. (1990) descreveram o processo de produção de grânulos miceliais de *Metarhizium anisopliae*, utilizando glicose e extrato de levedura, em fermentação líquida. Os grânulos foram separados da cultura por centrifugação, lavados em água e secos à temperatura de 50°C.

O processo de secagem foi interrompido quando o conteúdo de água foi menos de 10% na biomassa. O produto final conhecido como BIO 1020 consiste de grânulos de 0.5 a 1.0 mm de diâmetro. Os autores mencionaram que a armazenagem na presença de oxigênio influencia negativamente o BIO 1020. Este permanece viável por 8 meses à 4°C, porém a conservação foi aumentada para 18 meses nessa temperatura, quando foi armazenado a vácuo. Quando foi mantida a 20°C, a viabilidade foi reduzida para 5 meses. A atividade biológica foi testada contra *Otiiorhynchus sulcatus*, provocando 60-100% de mortalidade.

STOREY et al. (1990) trabalhando com grânulos de micélio de *M. anisopliae*, verificaram que mais de 85% dos grânulos armazenados a 27°C permaneciam viáveis após 49 dias, enquanto que mais de 91% permaneceram viáveis quando a temperatura de armazenamento foi 4°C. A temperatura de armazenagem afetou significativamente a conidiogênese após 300 dias. Os grânulos armazenados a 4°C produziram 4.5×10^5 conídios/grânulo, enquanto aqueles armazenados a 27°C produziram 3.9×10^4 conídios. A média de viabilidade de conídios provenientes de grânulos de ambas as temperaturas foi superior a 92%. A 20 e 26°C a concentração conidial por grama de solo alcançou o máximo de 2.0×10^7 após 4 dias. Solos com 15°C ou menos apresentam poucos conídios por grama após 4 dias. A esporulação foi mais elevada em turfa do que em solo sílico-argiloso, no entanto a umidade não pareceu ter efeito sobre a formação de conídios em ambos os solos.

KRUEGER et al. (1991) estudaram o efeito da umidade e temperatura do solo sobre a eficiência de partículas de micélio seco de *Metarhizium anisopliae* contra *Popillia japonica* e partículas de *Beauveria bassiana* contra *Rhizotrogus majalis*, em laboratório. A mortalidade de *P. japonica* foi mais rápida em solos com 11% de umidade a 27°C e mais lenta em solos com 17,5% de umidade a 21°C. A proporção de *P. japonica* com esporulação foi influenciada pela umidade, temperatura e dose de fungo. Em contraste, a mortalidade de *R. majalis* foi afetada apenas pela temperatura do solo, sendo mais elevada em solos a 21°C, em relação aqueles com 27°C. A sobrevivência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi influenciada pela umidade do solo, sendo favorecida em solos com baixo conteúdo de umidade.

ANDERSCH (1992) pesquisando a produção e formulação de *Metarhizium anisopliae* na Alemanha, mencionou que o único microorganismo que conseguiu importância no mundo inteiro no controle de pragas foi *Bacillus thuringiensis*. Em 1989, agentes biológicos utilizaram apenas 0.5% (aproximadamente cem milhões de dólares) do volume de recursos gastos mundialmente com proteção de plantas, sendo que mais de 90% dessa soma foi utilizada apenas por *B. thuringiensis*.

O mesmo autor refere-se então a produção do BIO 1020, um granulado insolúvel, com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, consistindo inteiramente de micélio de *M. anisopliae*, desenvolvido para manter estabilidade pelo menos

durante 6 meses. A preservação desse produto é referida como modelo entre os agentes microbianos, sendo sua viabilidade e atividade biológica mantidas pelo empacotamento a vácuo e armazenagem a 4°C. Nessas condições, a atividade biológica desse formulado é mantida durante 12 meses. O processo foi patenteado (ANDERSCH et al., 1990).

KRUEGER et al. (1992) verificaram em laboratório que a mortalidade de larvas de *Rhizotrogus majalis* e *Popillia japonica*, ocorreu mais rapidamente em solos inoculados com partículas de micélio seco quando comparado aos conídios de *M. anisopliae*. Porém a mortalidade total não diferiu significativamente entre os dois tipos de inóculos.

STENZEL et al. (1992) apresentam uma formulação granular com micélio de *M. anisopliae* (raça DSM 3884) desenvolvida para o uso em horticultura. Os grânulos foram mais efetivos quando misturados no solo na proporção de 1.0 g/litro de solo. Trabalhos desenvolvidos no período de 1989 a 1991 conseguiram controle de 74 a 81% sobre pragas de plantas ornamentais.

HARRISON et al. (1993) estudaram em laboratório o efeito de sete tipos de solo, 3 densidades, 6 misturas de solo e pH variando de 5 a 8, sobre a conidiogênese de dois isolados de *M. anisopliae* (BIO 1020 e MADA) na forma de grânulo micelial. A conidiogênese

(esporulação) foi mais alta em solo de vasos "potting soils" seguido de areia cúprica (270ppm em Cu), areia fina, turfa e areia "Candler", sendo que após 1 a 3 semanas foi similar em solos autoclavado e natural. Em 3 semanas de incubação os grânulos não aumentaram significativamente a produção de conídios, quando comparado com uma semana de incubação. Quanto a areia "Candler", não houve diferença significativa na conidiogênese com pH variando de 5 a 8.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As pesquisas foram conduzidas com os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* Vuill., no Laboratório de Patologia de Insetos e campo experimental do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, São Paulo.

3.1. Linhagens dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*

Foram utilizadas as linhagens E₉ de *M. anisopliae*, procedente de Vitória (ES), tendo como hospedeiro original a cigarrinha de pastagens *Deois flavopicta* e a linhagem 447 de *B. bassiana*, proveniente de Cuiabá-MS, isolada da formiga *Solenopsis invicta*, as quais fazem parte da micoteca do Laboratório de Patologia de Insetos.

3.2. Inseto utilizado

A patogenicidade das preparações foi avaliada utilizando-se lagartas de terceiro instar de *Diatraea saccharalis*, provenientes da criação do Laboratório de

Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, criadas em dieta artificial modificada de HENSLEY & HAMMOND (1968).

3.3. Etapas da pesquisa

3.3.1. Passagem dos isolados do óleo Nujol para BDA com antibiótico, teste de patogenicidade em *D. saccharalis* e reisolamento dos fungos

Os isolados foram retirados do óleo e transferidos para placa de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Agar com 0,05% de sulfato de estreptomicina (BDA com antibiótico), colocadas em estufa para BOD à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com 12 horas de fotofase.

Após a esporulação dos fungos, que ocorreu depois de 8 a 10 dias, foram preparadas suspensões de conídios dos respectivos fungos que foram utilizadas para inoculação por imersão de 30 lagartas de *D. saccharalis* para cada patógeno. Após esse procedimento, efetuou-se o reisolamento dos mesmos, utilizando-os com baixo número de repicagens nas fases seguintes do trabalho.

3.3.2. Produção de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em meio semi-sólido

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram produzidos em meio semi-sólido, utilizando-se arroz pré-cozido, em sacos de polipropileno e bandejas plásticas, conforme metodologia proposta por ALVES & PEREIRA (1989).

Em seguida os meios com arroz e conídios foram peneirados manualmente em peneira de 1.25mm de malha. Posteriormente foram retiradas amostras de conídios para quantificação, cálculo de umidade e avaliação da viabilidade do material. Os conídios restantes foram acondicionados em sacos de polipropileno e armazenados em freezer a -7°C para a etapa de preparações.

A quantificação dos conídios foi efetuada mediante a suspensão de 0.1g de conídios em 10ml de água estéril mais 0.1% de Tween 80[®], utilizando-se um microscópio de contraste de fase, com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Para o cálculo de umidade, foram tomadas 2 amostras de 1.0g de cada fungo, sendo colocadas em placas de Petri e levadas a estufa FANEM a 70°C para secagem até que as amostras apresentassem peso constante. A umidade foi calculada pela fórmula:

$$\% U = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100, \text{ onde:}$$

P_i = Peso inicial da amostra;

P_f = Peso final da amostra.

Para os testes de viabilidade, foram preparadas suspensões com 0.1g de conídios de cada fungo em 10ml de água estéril com 0.1% de Tween 80. Posteriormente, foram transferidas 0.1 ml de suspensão para placas de Petri contendo meio BDA mais antibiótico, espalhando-se a suspensão com auxílio de uma alça de Drigalsky e incubando-as em estufa para BOD a 26±1°C. As leituras foram efetuadas contando-se 100 conídios por repetição. 24 horas após o plaqueamento.

3.3.3. Testes com agentes molhantes e emulsificantes

O desenvolvimento dessa etapa foi feito com o auxílio do Centro Piloto de Formulações de Defensivos Agrícolas do Instituto Biológico de Campinas.

Os agentes molhantes e emulsificantes constam na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de agentes molhantes e emulsificantes testados.

Produto	Procedência	Nome químico
SURFAX 585	Aquatec Química S/A	Tiooctil Sulfocicinato de Sódio + Benzoato de Sódio
SURFAX 250	Aquatec Química S/A	Alquil Sulfato de Sódio
SURFOM 950	Ultraquímica	Nonil Fenol Etoxilado
ULTRA AGRIMUL	Ultraquímica	Naftaleno Formaldeído Sulfonato de Sódio
DREWFAX 550	Aquatec Química S/A	Alquil Sulfossuccinato de Sódio
RENEX 80	Ultraquímica	Nonilfenol Poliglicoleter
RENEX 40	Ultraquímica	Nonilfenol Poliglicoleter
UNITOL L30	Ultraquímica	Álcool Graxo Poliglicoleter

Os aditivos anteriormente referidos foram testados para verificação da compatibilidade com os conídios das linhagens E₉ (*M. anisopliae*) e 447 (*B. bassiana*).

Inicialmente foram preparadas placas de Petri contendo 20ml de meio BDA mais antibiótico, com 1 e 2% de molhantes e 2 a 5% de emulsificantes.

Após a preparação dos meios, foram plaqueadas suspensões de conídios dos fungos, conforme referido no item 3.3.2. (teste de viabilidade). Nesta fase, as leituras foram efetuadas após 24 e 48 horas, a fim de se detectar a viabilidade e possíveis efeitos de retardamento sobre a germinação dos conídios. Para evitar efeitos adversos durante o armazenamento, foi reduzido ao máximo a concentração desses aditivos, até o limite que permitisse a mistura dos entomopatógenos, especialmente *M. anisopliae*, com os inertes e soluções de açúcares. Desta forma foi utilizado 0,25% de Surfax 585 para as preparações com pós e 5% Renex 80, para as preparações em óleos.

3.3.4. Escolha de diluentes ou veículos

Baseados na literatura específica (ALVES et al., 1987 e ALVES et al.²; AUGUSTO et al., 1988) e para o atendimento das exigências dessas pesquisas, foram eleitos os diluentes sólidos seguintes: Filito OB-YB, Caulim, Diatomito, Syloid 63 FP (silica gel micronizada) e amido de milho (Maizena Duryea).

² ALVES, S.B.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M.; VIEIRA, S.A. (ESALQ/USP, Piracicaba, SP). Formulação e armazenamento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado 447. (Em elaboração).

Syloid 63 FP (sílica gel micronizada) e amido de milho (Maizena Duryea).

Para as formulações a base de óleos, foram utilizados o óleo mineral não emulsionável OPA-Petrobrás e óleo vegetal de girassol, marca Cocinero, Molinos.

3.3.5. Escolha de adjuvantes

Foram utilizados como prováveis preservadores dos fungos em estudo, soluções dos açúcares Dextrose, Maltose e Lactose, Leite desnatado e Mel de Abelha, inicialmente nas concentrações de 5 e 15%.

3.3.6. Formulações dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* com inertes e adjuvantes

Esta etapa da pesquisa constou de três fases: na primeira, as formulações foram armazenadas à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ visando selecionar os melhores tratamentos para a segunda fase, quando as formulações foram armazenadas em três temperaturas, $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $30 \pm 1^\circ\text{C}$. A terceira fase, constou de formulações com micélios submetidas às temperaturas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Todas as formulações foram armazenadas em estufa para BOD e fotofase de 12 horas.

3.3.6.1. Formulações com *M. anisopliae* (primeira fase)

Para a obtenção das formulações, inicialmente efetuaram-se as misturas do fungo com cada inerte, na proporção de 1:1, em seguida com 0,25% de Surfax 585 e finalmente com a solução de açúcar em volume igual ao peso dos demais componentes. Estes, foram misturados em tubos plásticos medindo 8,0 cm de altura por 3,0 cm de diâmetro e capacidade para 50 ml e em seguida colocadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro e levadas para secagem, durante 4 horas, em unidade de fluxo laminar VECO, à temperatura de 30°C.

Após a secagem, duas gramas de cada preparação foram colocadas em recipientes plásticos medindo 3,0 centímetros de altura por 2,5 cm de diâmetro e capacidade para 13 ml. Esses tubos foram vedados com Parafilm[®], sendo que de cada formulação 3 repetições foram armazenados em estufas a 30±1°C e fotofase de 12 horas.

Com o objetivo de avaliar a umidade inicial das formulações por ocasião do armazenamento, a quarta repetição foi colocada em placa de Petri sendo levada a estufa a 70°C, e aí mantida até peso constante para o cálculo da umidade.

3.3.6.2. Experimentos com as formulações de *M. anisopliae*

Foram efetuados 4 experimentos utilizando a linhagem E₉ de *M. anisopliae* em combinação com inertes, um agente molhante e adjuvantes.

a) Experimento 1.. *M. anisopliae* (E₉) mais Dextrose

Este experimento constou de 13 tratamentos com quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial.

Os tratamentos foram:

- Trat. 1. 1g de fungo puro (conídios)
- Trat. 2. 1g de conídios + 1ml de Dextrose (Dx) a 5%
- Trat. 3. 1g de conídios + 1ml de Dextrose (Dx) a 15%
- Trat. 4. 1g de conídios + 1g de Caulim + 2ml de Dx a 5%
- Trat. 5. 1g de conídios + 1g de Caulim + 2ml de Dx a 15%
- Trat. 6. 1g de conídios + 1g Filito + 2ml de Dx a 5%
- Trat. 7. 1g de conídios + 1g Filito + 2ml de Dx a 15%
- Trat. 8. 1g de conídios + 1g Diatomito + 2ml Dx a 5%
- Trat. 9. 1g de conídios + 1g Diatomito + 2ml Dx a 15%
- Trat. 10. 1g de conídios + 1g Syloid + 2ml Dx a 5%
- Trat. 11. 1g de conídios + 1g Syloid + 2ml Dx a 15%
- Trat. 12. 1g de conídios + 1g Maizena + 2ml Dx a 5%
- Trat. 13. 1g de conídios + 1g Maizena + 2ml Dx a 15%

**b) Teste de viabilidade de conídios das
formulações antes do armazenamento**

Com auxílio de uma alça de platina as preparações foram levemente tocadas e levadas a placas de Petri com meio BDA + Antibiótico. Posteriormente foram espalhadas com alça de Drigalsky e em seguida incubadas a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa para BOD com fotofase de 12 horas. As leituras foram efetuadas após 24 horas, em microscópio ótico, marca OLYMPUS-CBA, contando-se 100 conídios por repetição.

**c) Teste de viabilidade de conídios das
formulações durante o armazenamento**

As formulações foram inicialmente avaliadas após 8, 15 e 30 dias de armazenamento, sendo posteriormente avaliadas a cada trinta dias, até a perda de viabilidade. O procedimento foi o mesmo descrito anteriormente para as preparações, por ocasião do armazenamento.

Os experimentos números 2, 3 e 4 tiveram o mesmo número de tratamentos, repetições, delineamento experimental, metodologia de armazenamento e cálculo de umidade semelhantes ao experimento 1, diferindo apenas quanto aos adjuvantes.

**Experimento 2 - *M. anisopliae* (E₉) mais
Maltose**

**Experimento 3 - *M. anisopliae* (E₉) mais
Leite desnatado**

**Experimento 4 - *M. anisopliae* (E₇) mais
Mel de flores silvestre**

**3.3.6.3. Formulações com *Beauveria bassiana*
(primeira fase)**

A semelhança dos experimentos com *M. anisopliae*, inicialmente o fungo foi misturado com os inertes na proporção de 1:1, em seguida com o agente molhante e finalmente com a solução de açúcar em volume igual ao peso dos demais componentes. Após a mistura o material foi colocado em placas de Petri de 15 centímetros de diâmetro para secagem durante 4 horas em unidade de fluxo laminar a 30°C. Depois dessa secagem uma grama de cada preparação foi acondicionada em recipientes plásticos, medindo 3,0 centímetros de altura por 2,5 centímetros de diâmetro e capacidade para 13ml, os quais foram vedados com membrana Parafilm[®] para diminuir a troca de umidade e em seguida levados a estufa a 30±1°C e fotofase de 12 horas. A umidade inicial das preparações foi calculada através da quarta repetição, secando-se a amostra em estufa FANEM a 70°C. até atingir peso constante.

3.3.6.4. Experimentos com as formulações de

B. bassiana

Foram efetuados 4 experimentos utilizando *B. bassiana* linhagem 447, igualmente em combinação com inertes, agente molhante e adjuvantes.

Experimento 1. *B. bassiana* (447) mais dextrose

Este experimento constou de 13 tratamentos com quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial, sendo três repetições para armazenamento em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas e uma quarta repetição foi levada a estufa FANEM a 70°C até peso constante, para avaliação de umidade.

Os tratamentos foram:

- Trat. 1. 0,5g de fungo puro (conídios)
- Trat. 2. 0,5g de conídios + 0,5ml solução Dextrose (Dx) a 5%
- Trat. 3. 0,5g de conídios + 0,5ml solução Dextrose (Dx) a 15%
- Trat. 4. 0,5g de conídios + 0,5g Caulim + 1ml (Dx) a 5%
- Trat. 5. 0,5g de conídios + 0,5g Caulim + 1ml (Dx) a 15%
- Trat. 6. 0,5g de conídios + 0,5g Filito + 1ml (Dx) a 5%
- Trat. 7. 0,5g de conídios + 0,5g Filito + 1ml (Dx) a 15%
- Trat. 8. 0,5g de conídios + 0,5g Diatomito + 1ml (Dx) a 5%
- Trat. 9. 0,5g de conídios + 0,5g Diatomito + 1ml (Dx) a 15%

- Trat. 10. 0,5g de conídios + 0,5g Syloid + 1ml (Dx) a 5%
Trat. 11. 0,5g de conídios + 0,5g Syloid + 1ml (Dx) a 15%
Trat. 12. 0,5g de conídios + 0,5g Maizena + 1ml (Dx) a 5%
Trat. 13. 0,5g de conídios + 0,5g Maizena + 1ml (Dx) a 15%

**b) Teste de viabilidade de conídios das
formulações, antes e durante o
armazenamento**

Conforme procedimento com *M. anisopliae*, os tratamentos foram plaqueados em BDA mais antibiótico, incubados durante 24 horas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, efetuando-se contagem de 100 conídios por repetição.

Os experimentos números 2, 3 e 4 tiveram os tratamentos, repetições, delineamento experimental e metodologias semelhantes ao experimento 1, diferindo apenas em relação aos adjuvantes.

Experimento 2 - *B. bassiana* (447) mais Maltose

Experimento 3 - *B. bassiana* (447) mais Lactose

Experimento 4 - *B. bassiana* (447) mais Mel de
flores silvestre.

Essa fase da pesquisa foi interrompida aos 60 dias do armazenamento das formulações com os patógenos a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, visando selecionar inertes e adjuvantes para a fase seguinte.

Dessa forma, considerando que na segunda etapa as formulações seriam colocadas em três diferentes temperaturas, foi feita a opção de selecionar um inerte, quatro adjuvantes e eleger um segundo inerte.

O primeiro inerte selecionado foi syloid, em função dos resultados obtidos nessa pesquisa e nos trabalhos com formulações de *B. bassiana* desenvolvidos por

ALVES et al.⁴. O segundo inerte, amido de arroz, em decorrência do tratamento 1 (que contém em torno de 20% de amido de arroz) ter melhor suportado o armazenamento em 6 dos 8 experimentos dessa fase, na temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Com relação aos adjuvantes, foram selecionados, mel silvestre e lactose, pelo bom desempenho com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente; dextrose que ofereceu proteção para o armazenamento de *B. bassiana* à temperatura de 22°C (PEREIRA & ROBERTS, 1990) e mel de eucalipto, objetivando-se envolver outro tipo de mel nessa pesquisa.

3.3.6.5. Formulações com conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (segunda fase)

Nesta fase, foram utilizados óleos e alguns dos inertes e adjuvantes selecionados na primeira fase, e as formulações foram armazenadas nas temperaturas de 20, 25 e $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

⁴ ALVES, S.B.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M.; VIEIRA, S.A. (E3ALQ/USP, Piracicaba, SP). Formulação e armazenamento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado 447. (Em elaboração).

**3.3.6.6. Experimentos com as formulações de
M. anisopliae e *B. bassiana*
(segunda fase)**

Foram realizados três experimentos na seguinte ordem:

**a) Experimento 1. Efeito da temperatura sobre
formulações de *M. anisopliae* e
B. bassiana em óleos**

A elaboração das formulações desse experimento obedeceu o seguinte procedimento: inicialmente os conídios dos fungos foram colocados em erlenmayer com 250 ml de volume, em seguida o óleo mineral não emulsionável OPA-Petrobrás (OMNE) ou o óleo de girassol (OVG) e quando foi necessário, água e emulsificante Renex 80, a 5% levando-se ao agitador Phoenix Mod At-56 durante 5 minutos. Posteriormente, as formulações foram colocadas em tubos plásticos medindo 4 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro com capacidade de 18 ml e armazenadas em estufa para BOD nas temperaturas de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas. Essas formulações tiveram uma concentração de 10^9 conídios/ml.

Este experimento constou de 8 tratamentos com 3 repetições em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial.

Os tratamentos foram:

- Trat. 1. 0,2g de conídios de *M. anisopliae* + 10ml OMNE
- Trat. 2. 0,1g de conídios de *B. bassiana* + 10ml OMNE
- Trat. 3. 0,2g conídios de *M. anisopliae* + 10ml OVG
- Trat. 4. 0,1g de conídios de *B. bassiana* + 10ml OVG
- Trat. 5. 0,2g de conídios de *M. anisopliae* + 10ml OVG +
0,65 ml de Renex 80 + 2,15 ml de água estéril

- Trat. 6. 0,1g de conídios de *B. bassiana* + 10ml OVG +
0,65 ml de Renex 80 + 2,25 ml de água estéril
- Trat. 7. 1 g de conídios de *M. anisopliae* puro
- Trat. 8. 0,5 g de conídios de *B. bassiana* puro

Finalmente, foi retirado de cada tratamento, amostras para testes de viabilidade e patogenicidade, sobre lagartas do terceiro estágio de *D. saccharalis*.

Os testes de viabilidade foram realizados inicialmente após 8, 15 e 30 dias de armazenamento, sendo posteriormente avaliadas a cada trinta dias, até perda de viabilidade, efetuando-se leituras com 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento, a fim de registrar possíveis efeitos de retardamento sobre a germinação dos conídios.

Foram utilizados nesse experimento, recipientes de plástico tipo conta gotas para permitir fácil manuseio. Assim sendo, por ocasião dos testes de viabilidade, os recipientes foram agitados e posteriormente era colocada uma gota da suspensão de cada repetição em meio BDA mais antibiótico e meio de MILNER et al. (1971), este último com a seguinte composição: 0.1% de extrato de levedura, 0.1% de cloranfenicol, 0.01% de Tween 80 e 0,001% de Benlate. Foi acrescentado 16g de agar DIFCO por litro, para solidificação do meio. Este meio facilitou a leitura de viabilidade com 24, 48 e 72 horas, sem ocorrência de esporulação de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, nem a presença de contaminantes. Em seguida as amostras foram espalhadas com alça de Drigalsky e incubadas a

26±1°C em estufa para BOD. Foi utilizada também a técnica de emulsificação dos óleos, através da centrifugação das suspensões durante 10 minutos a 2.500 rpm, bem como utilização de Tween 80 para ressuspender os conídios, a fim de facilitar as leituras, conforme metodologia utilizada por DAoust et al. (1983).

A patogenicidade das preparações de ambos os fungos foi avaliada através de bioensaios com lagartas do terceiro instar de *D. saccharalis*. Foram utilizadas 50 lagartas, pulverizadas com 1ml de suspensão dos respectivos fungos na concentração de 10⁸ conídios, utilizando-se um microatomizador "Paasche Airbrush", elétrico, acoplado em um compressor com 15 libras de pressão. Em seguida, as lagartas foram acondicionadas individualmente em placas de bioensaio, contendo pequenos pedaços de colmo de milho para alimentação. Diariamente, no período de dez dias, estas foram avaliadas para constatação de mortalidade e troca de alimento. A mortalidade foi corrigida e acumulada, efetuando-se a análise de Probit para cálculo das TL₅₀ das diferentes formulações.

As formulações de *M. anisopliae* e *B. bassiana* com óleo de girassol mais o emulsificante Renex 80, foram descartadas das avaliações devido a dificuldade de efetuar leituras de viabilidade, apesar das mesmas esporularem abundantemente, logo após as preparações e até 30 dias de armazenamento, nas temperaturas de 20 e 25±1°C.

**b) Experimento 2. Efeito da temperatura sobre
formulações pós molháveis de *M.
anisopliae* com açúcares, méis e inertes**

Nesta fase, inicialmente foi efetuada a mistura do fungo com o agente molhante Surfax 585 a 0.25% em seguida com as soluções de açúcares e méis, sendo que foram utilizadas soluções de açúcares e méis a 30%, objetivando conferir melhor preservação dos conídios. As misturas foram colocadas em Erlenmayer de 250ml e agitadas durante 5 minutos. Para secagem, esse material foi colocado em bandejas de alumínio forradas com papel alumínio e deixadas na unidade de fluxo laminar VECD a 30°C, durante 8 horas.

Após a secagem uma parte das misturas padrões Dextrose, Lactose, Mel Silvestre e Mel de Eucalipto foi armazenada (tratamentos específicos) e outra parte foi misturada com Syloid e Creme de arroz, na proporção de uma parte de fungo para uma parte do inerte (1:1).

Em seguida, foram pesadas 2 gramas de cada preparação e acondicionadas em tubos plásticos de 3.0 centímetros de altura por 2.5 centímetros de diâmetro, iguais aos utilizados na primeira etapa dos experimentos. Conforme procedimento da primeira fase, os recipientes também tiveram as bordas vedadas por membrana Parafilm®.

Este experimento constou de 14 tratamentos com 4 repetições, em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial. Três repetições foram armazenadas em estufa

para BOD a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ com fotofase de 12 horas e a quarta repetição foi levada a estufa FANEM a 70°C até peso constante para verificação de umidade.

Os tratamentos foram os seguintes:

- Trat. 1. 3g de arroz + conídios, provenientes da bandeja de produção (meio com arroz)
- Trat. 2. 1g de fungo puro (conídios)
- Trat. 3. 1g de conídios + 1 ml sol Dx 30%
- Trat. 4. 1g de conídios + 1 ml sol LC 30%
- Trat. 5. 1g de conídios + 2 ml sol Dx 30%
+ 1g de Syloid
- Trat. 6. 1g de conídios + 2 ml sol Dx 30%
+ 1g de creme de arroz
- Trat. 7. 1g de conídios + 2ml sol Lc 30% + 1g
de Syloid
- Trat. 8. 1g de conídios + 2ml sol Lac 30% + 1g
de creme de arroz
- Trat. 9. 1g de conídios + 1ml de Mel Silvestre a 30%
- Trat. 10. 1g de conídios + 1ml de Mel de Eucalipto 30%
- Trat. 11. 1g de conídios + 2ml de Mel Silvestre 30% +
1g de Syloid
- Trat. 12. 1g de conídios + 2ml de Mel Silvestre 30% +
1g de Creme de Arroz
- Trat. 13. 1g de conídios + 2ml de Mel de Eucalipto 30% +
1g de Syloid
- Trat. 14. 1g de conídios + 2ml de Mel de Eucalipto 30% +
1g de Creme de Arroz

Amostras das preparações foram retiradas para verificação de viabilidade e patogenicidade, por ocasião do armazenamento. A viabilidade foi acompanhada a partir de 8

dias e subsequentemente aos 15 e 30 dias, e até quando houve viabilidade.

Experimento 3. Efeito da temperatura sobre formulações pós molháveis de *B. bassiana* com açúcares, méis e inertes

Esse experimento também constou de 14 tratamentos com 4 repetições e dos mesmos tratamentos. açúcares, méis e inertes já referidos no experimento anterior.

3.3.7. Produção de micélios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em meio líquido

O meio de cultura utilizado para a produção de micélios teve a seguinte composição: caldo de batata inglesa, 1,5% de dextrosol, 1% de extrato de levedura e 0,05% de sulfato de estreptomicina.

Após autoclavagem a 120°C por 20 minutos transferiu-se 50ml do meio para 40 garrafas de vidro com capacidade para 250ml.

Depois do resfriamento, 20 garrafas foram inoculadas com 1,5ml de suspensão contendo 4.8×10^8 conídios/ml de *M. anisopliae*, sendo as demais garrafas (20) inoculadas com 1,5ml da suspensão contendo 1.6×10^7 conídios/ml de

B. bassiana. Em seguida as garrafas foram transferidas para um agitador incubador orbital, marca Tecnol TE-420 a $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 120 rotações por minuto.

Decorridos 5 dias as garrafas foram retiradas do agitador e levadas para geladeira onde foram mantidas durante 48 horas.

Posteriormente, uma parte da massa micelial produzida foi preparada com amido de milho pregelatinizado, outra parte com alginato de sódio e uma terceira, sem qualquer tratamento, foi colocada para secagem.

3.3.8. Preparação de amido pregelatinizado

O amido de milho pregelatinizado foi produzido, conforme metodologia proposta por PEREIRA (1987), misturando-se 90g de amido de milho (Maizena-Durvea) em 300ml de água deionizada. Em seguida essa mistura foi cozida em fogo brando até formar uma pasta, sendo em seguida autoclavada a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 1400ml de etanol a 96% para provocar a precipitação do amido. Finalmente, procedeu-se a filtragem do material que foi colocado para secar em unidade de fluxo laminar VECO durante quatro horas, obtendo-se 70g de amido de milho pregelatinizado.

3.3.9. Formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Para a preparação das formulações, foram levados ao liquidificador, separadamente, 900ml de meio contendo massa micelial de cada fungo e batidos durante 60 segundos. Em seguida, os líquidos densos resultantes foram divididos em três porções:

- a) 400ml destinados a formulações com alginato de sódio;
- b) 400ml para formulações com amido de milho pregelatinizado;
- c) 100ml para filtragem em filtro de Buchner, secagem na unidade de fluxo laminar e utilizados como controle.

Dessa forma, foram obtidos 900 ml de meio contendo massa micelial de *B. bassiana* e 900 ml com *M. anisopliae*.

a) Formulações com alginato de sódio

Os frascos contendo 400ml de meio mais a massa micelial em suspensão de cada fungo, foram deixados por um período de 4 horas para decantação. Após esse período foram eliminados 100ml de sobrenadante. As suspensões com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* resultantes foram misturadas individualmente com 4 gramas de alginato de sódio, previamente diluído em 8 ml de álcool 96% e depois levado ao liquidificador por 60 segundos, adicionando-se também 6

gramas de amido de milho, visando oferecer maior consistência à preparação.

A mistura de cada fungo, com aspecto de líquido denso, foi colocada em funil provido de torneira de borracha e gotejada em 200 ml de uma solução de cloreto de cálcio $2H_2O$ a 4%. O contato das gotas contendo micélio mais alginato com a solução cálcica originaram grânulos envolvidos por um precipitado insolúvel, oriundo da substituição do sódio pelos ions de cálcio. Essa metodologia de formulação foi baseada naquela desenvolvida por PEREIRA & ROBERTS (1991).

Os grânulos formados foram colocados em peneira para secagem na unidade de fluxo laminar durante 24 horas. Em seguida, porções com 1.5g foram armazenadas em tubos plásticos, medindo 3,0cm de altura por 2.5cm de diâmetro e capacidade para 13ml. Foram efetuadas três repetições e os tubos foram fechados e armazenados em estufa para BOD nas temperaturas de $25 \pm 1^\circ C$, $30 \pm 1^\circ C$ e $35 \pm 1^\circ C$, sendo que nessa fase os tubos não tiveram as bordas vedadas. Paralelamente foi retirada uma amostra para determinação do teor de umidade da formulação.

A capacidade de esporulação foi avaliada plaqueando-se amostras das preparações em BDA mais antibiótico, antes do armazenamento e após 15, 30, 60, 90 e 120 dias.

**b) Formulações com amido de milho
pregelatinizado**

A exemplo da preparação com alginato, os frascos contendo 400ml de meio e micélio em suspensão foram submetidas a decantação. Após essa fase, foram eliminados 200ml de sobrenadante, da massa micelial de *B. bassiana* e 100ml da suspensão contendo micélio de *M. anisopliae*. Em seguida, adicionaram-se 25 gramas de amido pregelatinizado à suspensão micelial resultante de cada fungo, levando-se separadamente ao liquidificador durante 60 segundos para homogeneização. Posteriormente, as misturas foram colocadas para secar sobre papel alumínio dentro da unidade de fluxo laminar, durante 24 horas. Essa metodologia também foi desenvolvida a partir de PEREIRA & ROBERTS (1991).

Após a secagem colocaram-se 1,5 gramas da preparação em tubos plásticos medindo 3,0cm de altura por 2,5cm de diâmetro e capacidade para 13ml. Foram efetuadas três repetições e os recipientes foram levados às estufas reguladas nas temperaturas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

A exemplo das formulações com alginato, a capacidade de esporulação destas, também foram determinada antes da armazenagem, e após 15, 30, 60, 90 e 120 dias, plaqueando-se porções da mesma em BDA com antibiótico.

c) Massa micelial sem preparação

Após a secagem, porções com 0,7g de micélio de *B. bassiana* e 0,9g de micélio de *M. anisopliae*, foram

armazenadas em tubos plásticos, idênticos aos utilizados para as formulações com alginato e amido de milho, em 3 repetições e mantidas em estufas nas temperaturas de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. A capacidade de esporulação foi também avaliada antes do armazenamento e após 15, 30, 60, 90 e 120 dias, deixando-se de registrar o teor de umidade dessas preparações devido a pequena quantidade de material.

3.3.10. Experimentos com as formulações de micélios dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em condições de laboratório e campo

a) Laboratório

Conforme referido anteriormente, todas as formulações, juntamente com micélio seco puro de ambos os fungos, foram colocados em tubos plásticos e armazenados em estufas incubadora para BOD a 25, 30 e $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 120 dias.

O experimento, em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial e 3 repetições, constou dos 6 tratamentos seguintes:

- Trat. 1. Micélio puro de *B. bassiana*;
- Trat. 2. Micélio de *B. bassiana* com alginato de sódio;
- Trat. 3. Micélio de *B. bassiana* com amido de milho pregelatilizado;
- Trat. 4. Micélio puro de *M. anisopliae*;

Trat. 5. Micélio de *M. anisopliae* com alginato de sódio;

Trat. 6. Micélio de *M. anisopliae* com amido de milho pregelatinizado.

b) Capacidade de esporulação das formulações

A fim de se verificar a viabilidade e conidiogênese das formulações, foram colocadas em placas de Petri com BDA mais antibiótico, partículas destas, medindo aproximadamente 23,75 mm² e levadas para estufa BOD a 25±1°C durante o período de 7 dias. Transcorrido esse tempo, com o auxílio de um vazador marca Metalic, com 5,5mm de diâmetro, foram coletadas amostras das repetições A, B e C de cada tratamento. As amostras foram colocadas em tubo de dieta com água estéril e 0,1% de Tween 80, agitadas durante 60 segundos, sendo em seguida os conídios quantificados em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio com contraste de fase marca American Optical.

A capacidade de esporulação dos tratamentos antes e após o armazenamento também foi avaliada no solo. Para isso, foram utilizados copos plásticos com 8cm de diâmetro e 7cm de altura, com Terra Roxa Estruturada Eutrófica, úmida e pH 5,1. Foram inoculadas nos copos três amostras das preparações, os quais foram cobertos com vidro e levados a BOD a 26±1°C durante sete dias. Neste caso, foram registradas apenas as informações sobre a esporulação ou não dos fungos resultantes das formulações.

c) Campo

Este experimento teve por objetivo avaliar a capacidade de esporulação bem como as perdas de partículas das formulações deixadas no campo (Figura 1). Amostras dos tratamentos antes do armazenamento e aos 15, 30, 60 e 90 dias, mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, foram levadas ao campo, colocadas no solo a 1,0cm de profundidade e nas axilas e bainhas foliares de plantas de cana-de-açúcar com 8 meses de idade. As observações foram iniciadas em 29 de junho de 1993, em canavial localizado no campo experimental do Departamento de Entomologia, também em Terra Roxa Estruturada Eutrófica, A moderado, textura argilosa/muito argilosa (Kandiudalfic Eutrudox), conforme determinação de VIDAL-TORRADO & SPAROVEK, 1993.

Figura 1. Localização de partículas de micélios secos puros e formulados com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, colocados no solo, axilas e bainhas foliares de cana-de-açúcar. Piracicaba, 1993.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*

a) Produção de *M. anisopliae*

Foram produzidos dois lotes do fungo, para utilização nas duas primeiras fases da pesquisa.

No primeiro lote foram obtidos 420g de conídios, registrando-se $2,8 \times 10^{10}$ conídios/g, com 98% de viabilidade e 29,71% de umidade, após o peneiramento. A umidade da mistura conídios mais arroz, antes do peneiramento foi de 12,9%. No segundo lote, foram produzidos 350g de conídios, com $5,7 \times 10^{10}$ conídios/g, 98% de viabilidade e 17,6% de umidade, registrando-se ainda 13,0% de umidade para a mistura de conídios mais arroz.

b) Produção de *B. bassiana*

Foram produzidos dois lotes de *B. bassiana*, a exemplo do fungo anterior, para utilização na pesquisa. Obteve-se 150g de conídios no primeiro lote com $1,5 \times 10^{11}$

conídios/g, 100% de viabilidade, 12,5% de umidade depois do peneiramento e 13,9% de umidade para os conídios misturados com arroz. No segundo lote, produziram-se 230g de conídios, com $1,2 \times 10^{11}$ conídios/g, 100% de viabilidade e 15,5% de umidade. A umidade determinada para a mistura conídios mais arroz foi de 12,9%.

4.2. Compatibilidade dos fungos *M. anisopliae* e

B. bassiana com agentes molhantes e emulsificantes

Os resultados de viabilidade dos fungos plaqueados em BDA mais antibiótico submetidos a diferentes concentrações de agentes molhantes e emulsificantes são apresentados na Tabela 2.

A maioria desses agentes poderiam ser utilizados nas preparações dos fungos, sem que ocasionasse perda de viabilidade de imediato (Tabela 2). Com relação aos molhantes, apenas o Surfax 250 e Surfax 585, inibiram *M. anisopliae* com 24 horas de incubação quando utilizados na concentração de 2%, sendo que o efeito negativo do Surfax 250 foi observado até as 48 horas de incubação. Paralelamente, dos emulsificantes utilizados, foram prejudiciais nas duas concentrações, Drewfax 550 e Unitol L30, tanto para *M. anisopliae* como para *B. bassiana*.

Tabela 2. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, misturados com diferentes agentes molhantes e emulsificantes*. Temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Agentes	Concentração (%)	Horas de incubação	
		24	48
Molhantes			
Ma + Surfax 250	1	90.0	95.0
Ma + Surfax 250	2	0.0	0.0
Ma + Surfax 585	1	90.0	95.0
Ma + Surfax 585	2	0.0	95.0
Ma + Surfom 950	1	95.0	98.0
Ma + Surfom 950	2	95.0	98.0
Ma + Ultra Agrimul	1	95.0	98.0
Ma + Ultra Agrimul	2	95.0	98.0
Ma + BDA c/antibiótico		98.0	-
Emulsificantes			
Ma + Drewfax 550	2	0.0	10.0
Ma + Drewfax 550	5	0.0	0.0
Ma + Renex 80	2	98.0	-
Ma + Renex 80	5	98.0	-
Ma + Renex 40	2	98.0	-
Ma + Renex 40	5	98.0	-
Ma + Unitol L30	2	0.0	0.0
Ma + Unitol L30	5	0.0	0.0
Bb + Drewfax 550	2	0.0	10.0
Bb + Drewfax 550	5	0.0	0.0
Bb + Renex 80	2	100.0	-
Bb + Renex 80	5	100.0	-
Rb + Renex 40	2	100.0	-
Bb + Renex 40	5	100.0	-
Bb + Unitol L30	2	0.0	0.0
Bb + Unitol L30	5	0.0	0.0
BB + BDA c/antibiótico		100.0	-

Ma - conídios de *M. anisopliae*; Bb - conídios de *B. bassiana*
a - Média de 2 repetições.

4.3. Viabilidades de conídios de *M. anisopliae* nas formulações preparadas na primeira fase da pesquisa

Experimento 1. *M. anisopliae* (E₇) mais dextrose

As viabilidades médias dos conídios de *M. anisopliae*, armazenados durante o período de dois meses encontram-se na Tabela 3.

Pode-se observar na referida tabela que na temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, decorridos 30 dias de armazenamento, apenas o tratamento *M. anisopliae* (conídios) e as formulações 2, 4 e 10 apresentaram viabilidade acima de 60% e que aos sessenta dias, todas as formulações estavam inviáveis, com exceção de *M. anisopliae* (conídios) e a formulação 2, que apresentavam respectivamente, 20 e 17% de viabilidade. Esses resultados, de certa forma, eram esperados e estão coerentes com os trabalhos de BASTOS CRUZ et al., 1985, que verificaram rápida deterioração de conídios de *M. anisopliae*, quando armazenados na faixa de 26 a 30°C .

Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão apresentadas as viabilidades médias dos conídios das formulações de *M. anisopliae* dos experimentos com maltose, leite desnatado e mel silvestre.

Tabela 3. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis com dextrose. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento			
		8	15	30	60
1. Ma (conídios)	100	95.0a*	80.0ab	80.0a	20.0a
2. Ma + Dx 5% (1)	95	95.0a	95.0a	77.0a	17.0a
3. Ma + Dx 15% (2)	100	95.0a	93.0a	58.0abc	0.0a
4. Ma + CAO Dx 1	90	87.0a	80.0ab	67.0ab	0.0a
5. Ma + CAO Dx 2	100	87.0a	77.0ab	30.0cd	0.0a
6. Ma + FIL Dx 1	100	83.0a	73.0abc	17.0de	0.0a
7. Ma + FIL Dx 2	100	80.0a	0.0d	0.0e	0.0a
8. Ma + DIA Dx 1	100	92.0a	57.0bc	0.0e	0.0a
9. Ma + DIA Dx 2	100	88.0a	50.0c	0.0e	0.0a
10. Ma + SYL Dx 1	95	80.0a	80.0ab	70.0a	0.0a
11. Ma + SYL Dx 2	90	90.0a	90.0a	0.0e	0.0a
12. Ma + MAI Dx 1	90	83.0a	80.0ab	39.0bcd	0.0a
13. Ma + MAI Dx 2	90	87.0a	77.0ab	38.0bcd	0.0a

Ma - *M. anisopliae*

DIA - Diatomito

Dx 1 - Sol. de dextrose a 5%

SYL - Syloid

Dx 2 - Sol. de dextrose a 15%

MAI - Maizena

CAO - Caulim

FIL - Filito

AN/A - Antes do armazenamento

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Experimento 2. *M. anisopliae* (E₇) mais maltose

Na Tabela 4, verifica-se que apenas os tratamentos 1, 7 e 12 apresentaram-se com viabilidades elevadas aos 30 dias e o tratamento 1 (conídios) manteve-se com 22% até 60 dias. Resultados semelhantes foram obtidos no experimento 1 quando o fungo foi misturado com dextrose (Tabela 3).

Nesse experimento o tratamento Ma (conídios) mais maltose a 15% foi eliminado devido a contaminação com *Aspergillus flavus*.

Experimento 3. *M. anisopliae* (E₇) mais leite desnatado

Conforme pode-se observar na Tabela 5, aos 30 dias de armazenamento, as formulações 2 e 4 estavam inviáveis, enquanto que o tratamento 1 e formulações 3, 5 e 6, apresentavam viabilidades entre 70 e 95%. Decorridos 60 dias, os tratamentos com syloid mais leite estavam com 40% de viabilidade, enquanto que *M. anisopliae* (conídios), estava com apenas 15%.

Nesse experimento, foram eliminados aos sete dias, devido a contaminação por *A. flavus*, os tratamentos leite a 15%, caulim mais leite a 15%, filito mais leite a 5 e 15%, diatomito mais leite a 15% e maizena mais leite a 5 e 15%.

Tabela 4. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis com maltose. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento			
		8	15	30	60
1. Ma (conídios)	95	90,0a*	90,0a	90,0a	22,0a
2. Ma + ML 5% (1)	95	90,0a	80,0a	27,0de	0,0b
3. Ma + CAO ML 1	95	87,0a	87,0a	37,0cd	0,0b
4. Ma + CAO ML 2	100	80,0a	57,0bc	17,0def	0,0b
5. Ma + FIL ML 1	95	80,0a	80,0a	50,0bc	0,0b
6. Ma + FIL ML 2	95	80,0a	30,0d	0,0f	0,0b
7. Ma + DIA ML 1	95	90,0a	90,0a	67,0b	5,0ab
8. Ma + DIA ML 2	95	77,0a	70,0ab	13,0ef	0,0b
9. Ma + SYL ML1	95	80,0a	75,0ab	5,0f	0,0b
10. Ma + SYL ML 2	96	85,0a	70,0ab	0,0f	0,0b
11. Ma + MAI ML 1	90	80,0a	40,0cd	0,0f	0,0b
12. Ma + MAI ML 2	90	80,0a	70,0ab	70,0ab	3,0ab

Ma - *M. anisopliae*

FIL - Filito

ML 1 - Sol. de maltose a 5%

DIA - Diatomito

ML 2 - Sol. de maltose a 15%

SYL - Syloid

CAO - Caulim

MAI - Maizena

AN/A - Antes do armazenamento, não incluído na análise estatística.

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis com leite em pó. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento			
		8	15	30	60
1. Ma (conídios)	95	95,0a*	95,0a	95,0a	15,0ab
2. Ma + LEI 5% (1)	90	70,0ab	50,0b	0,0c	0,0b
3. Ma + CAO LEI 1	95	95,0a	95,0a	87,0ab	20,0ab
4. Ma + DIA LEI 1	90	50,0b	50,0b	0,0c	0,0b
5. Ma + SYL LEI 1	90	90,0a	90,0a	70,0b	40,0a
6. Ma + SYL LEI 2	90	90,0a	90,0a	80,0a	40,0a

Ma - *M. anisopliae*

DIA - Diatomito

LEI 1 - Leite em pó a 5%

SYL - Syloid

LEI 2 - Leite em pó a 15%

CAO - Caulim

AN/A - Antes do armazenamento

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Experimento 4. *M. anisopliae* (E₉) mais mel silvestre

A maioria dos tratamentos livres de contaminação, apresentaram a melhor performance de viabilidade aos 30 dias de armazenamento (Tabela 6). Decorridos 60 dias de armazenamento o tratamento syloid com mel a 5% apresentou 70% de viabilidade. Esse resultado indica que essa formulação deve ser melhor estudada em trabalhos futuros.

Nesse experimento, também ocorreram contaminações com *A. flavus* nos tratamentos mel a 15% e maizena mais mel a 5 e 15%.

Tabela 6. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis com mel. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento			
		8	15	30	60
1. Ma (conídios)	95	80,0a*	80,0a	80,0a	30,0bc
2. Ma + MEL 5% (1)	90	80,0a	63,0a	20,0b	0,0d
3. Ma + CAO MEL 1	90	80,0a	0,0b	0,0b	0,0b
4. Ma + CAO MEL 15% (2)	90	90,0a	90,0a	90,0a	15,0cd
5. Ma + FIL MEL 1	90	90,0a	90,0a	90,0a	60,0ab
6. Ma + DIA MEL 1	90	90,0a	90,0a	90,0a	50,0ab
7. Ma + SYL MEL 1	90	90,0a	90,0a	90,0a	70,0a
8. Ma + SYL MEL 2	95	90,0a	90,0a	90,0a	60,0ab

Ma - *M. anisopliae*

DIA - Diatomito

FIL - Filito

MEL 1 - Sol. mel a 5%

SYL - Syloid

MEL 2 - Sol. mel a 15%

CAO - Caulim

AN/A - Antes do armazenamento, não incluído na análise estatística.

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A contaminação por *A. flavus* verificada nos experimentos com leite desnatado e mel silvestre, pode ser atribuída a umidade mais elevada das amostras desses experimentos (Tabelas 33 a 36, Apêndice), como também devido a manipulação e temperatura de armazenamento, estando de acordo com os resultados de BASTOS CRUZ et al., 1985.

4.4. Viabilidade de conídios de *B. bassiana* nas formulações preparadas na primeira fase da pesquisa

Experimento 5. *B. bassiana* (447) mais dextrose

As viabilidades médias dos conídios de *B. bassiana*, aos 30 dias de armazenamento nos tratamentos 10, 1, 2, 3 e 12 encontravam-se entre 70 e 80% (Tabela 7).

Tabela 7. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis com dextrose. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento			
	8	15	30	60
1. Bb (conídios)	100,0	95,0a*	70,0b	40,0a
2. Bb + Dx 5% (1)	100,0	100,0a	70,0b	0,0b
3. Bb + Dx 15% (2)	100,0	100,0a	70,0b	0,0b
4. Bb + CAO Dx 1	100,0	100,0a	60,0c	0,0b
5. Bb + CAO Dx 2	100,0	95,0a	30,0f	0,0b
6. Bb + FIL Dx 1	100,0	100,0a	60,0c	0,0b
7. Bb + FIL Dx 2	100,0	100,0a	47,0e	0,0b
8. Bb + DIA Dx 1	100,0	95,0a	60,0c	0,0b
9. Bb + DIA Dx 2	100,0	95,0a	5,0g	0,0b
10. Bb + SYL Dx 1	100,0	95,0a	80,0a	0,0b
11. Bb + SYL Dx 2	100,0	100,0a	53,0d	0,0b
12. Bb + MAI Dx 1	100,0	100,0a	70,0b	0,0b
13. Bb + MAI Dx 2	100,0	95,0a	50,0de	0,0b

Bb - *B. bassiana*

CAO - Caulim

Dx 1 - Sol. de dextrose a 5%

FIL - Filito

Dx 2 - Sol. de dextrose a 15%

DIA - Diatomito

SYL - Syloid

MAI - Maizena

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 60 dias de armazenamento apenas o tratamento 1 (conídios) apresentava viabilidade de 40% e os demais estavam totalmente inviáveis.

Nas Tabelas 8, 9 e 10, são apresentadas as viabilidades médias dos conídios das formulações de *B. bassiana* dos experimentos com maltose, lactose e mel silvestre.

Experimento 6. *B. bassiana* (447) mais maltose

De acordo com a Tabela 8, verifica-se que o tratamento *B. bassiana* (conídios) e formulações 9, 5, 2, 3, 4, 10, 13, 6 e 7, mantiveram viabilidade elevadas aos 30 dias de armazenamento, sendo que decorridos 60 dias, apenas o fungo puro apresentou 10% de viabilidade e as demais formulações tornaram-se inviáveis.

Tabela B. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis com maltose. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento			
	8	15	30	60
1. Bb (conídios)	100,0	95,0c*	80,0c	10,0a
2. Bb + ML 5% (1)	100,0	98,0bc	80,0c	0,0b
3. Bb + ML 15% (2)	100,0	100,0a	80,0c	0,0b
4. Bb + CAO ML 1	100,0	98,0bc	80,0c	0,0b
5. Bb + CAO ML 2	100,0	100,0a	90,0b	0,0b
6. Bb + FIL ML 1	100,0	100,0a	70,0d	0,0b
7. Bb + FIL ML 2	100,0	100,0a	70,0d	0,0b
8. Bb + DIA ML 1	100,0	100,0a	50,0f	0,0b
9. Bb + DIA ML 2	100,0	100,0a	95,0a	0,0b
10. Bb + SYL ML 1	100,0	98,0bc	80,0c	0,0b
11. Bb + SYL ML 2	100,0	98,0bc	40,0g	0,0b
12. Bb + MAI ML 1	100,0	100,0a	60,0e	0,0b
13. Bb + MAI ML 2	100,0	100,0a	80,0c	0,0b

Bb - *B. bassiana*

CAO - Caulim

ML 1 - Sol. de maltose a 5%

FIL - Filito

ML 2 - Sol. de maltose a 15%

DIA - Diatomito

SYL - Syloid

MAI - Maizena

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Experimento 7. *B. bassiana* (447) mais lactose

Nesse experimento, excetuando-se o tratamento 9, todos os demais apresentavam viabilidade de 70 a 95% aos 30 dias. Após 60 dias de armazenamento, o tratamento 1 (conídios) ainda mantinha 40% de viabilidade (Tabela 9), as formulações com maizena estavam com 10% de viabilidade e as demais tornaram-se inviáveis.

Tabela 9. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis com lactose. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento			
	8	15	30	60
1. Bb (conídios)	100,0	100,0	80,0c*	40,0a
2. Bb + LC 5% (1)	100,0	100,0	90,0b	0,0c
3. Bb + LC 15% (2)	100,0	100,0	80,0c	0,0c
4. Bb + CAO LC 1	100,0	100,0	80,0c	0,0c
5. Bb + CAO LC 2	100,0	100,0	80,0c	0,0c
6. Bb + FIL LC 1	100,0	100,0	80,0c	0,0c
7. Bb + FIL LC 2	100,0	100,0	80,0c	0,0c
8. Bb + DIA LC 1	100,0	100,0	80,0c	0,0c
9. Bb + DIA LC 2	100,0	100,0	63,0e	0,0c
10. Bb + SYL LC 1	100,0	100,0	80,0c	0,0c
11. Bb + SYL LC 2	100,0	100,0	73,0d	0,0c
12. Bb + MAI LC 1	100,0	100,0	90,0b	10,0b
13. Bb + MAI LC 2	100,0	100,0	95,0a	10,0b

Bb - *B. bassiana*

CAO - Caulim

LC 1 - Sol. de lactose a 5%

FIL - Filito

LC 2 - Sol. de lactose a 15%

DIA - Diatomito

SYL - Syloid

MAI - Maizena

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Experimento 8. *B. bassiana* (447) mais
mel silvestre**

No último experimento dessa fase, aos 30 dias de armazenamento, o tratamento 1 (conídios) e formulações 10, 2, 4, 11, 12, 5 e 13 apresentavam viabilidades de 70 a 90%, sendo que o tratamento 1 (conídios) manteve-se com 10% de viabilidade aos 60 dias de armazenamento (Tabela 10), e as demais formulações, já estavam inviáveis.

Tabela 10. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis com mel. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento			
	8	15	30	60
1. Bb (conídios)	100,0	100,0	90,0a*	10,0a
2. Bb + MEL 5% (1)	100,0	100,0	80,0b	0,0b
3. Bb + MEL 15% (2)	100,0	100,0	50,0d	0,0b
4. Bb + CAO MEL 1	100,0	100,0	80,0b	0,0b
5. Bb + CAO MEL 2	100,0	100,0	70,0c	0,0b
6. Bb + FIL MEL 1	100,0	100,0	60,0d	0,0b
7. Bb + FIL MEL 2	100,0	100,0	23,0e	0,0b
8. Bb + DIA MEL 1	100,0	100,0	50,0d	0,0b
9. Bb + DIA MEL 2	100,0	100,0	13,0f	0,0b
10. Bb + SYL MEL 1	100,0	100,0	90,0a	0,0b
11. Bb + SYL MEL 2	100,0	100,0	80,0b	0,0b
12. Bb + MAI MEL 1	100,0	100,0	80,0b	0,0b
13. Bb + MAI MEL 2	100,0	100,0	70,0c	0,0b

Bb - *B. bassiana*

CAO - Caulim

MEL 1 - Sol. de mel a 5%

FIL - Filito

MEL 2 - Sol. de mel a 15%

DIA - Diatomito

SYL - Syloid

MAI - Maizena

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De modo geral, pode-se observar que houve uma maior variação nas médias de viabilidade das formulações com *M. anisopliae*. Com relação a *B. bassiana*, até aos 15 dias de armazenamento, praticamente não houve perda de viabilidade.

Para *M. anisopliae*, não levando em consideração o aspecto de contaminação, o adjuvante mel silvestre foi o que apresentou melhor resultado (Tabela 6). Para *B. bassiana*, a lactose apresentou a melhor performance entre os adjuvantes (Tabela 9).

No tratamento 1, os conídios puros, tanto para *M. anisopliae* nos experimentos 1 e 2, como para *B. bassiana*, nos experimentos 5, 6, 7 e 8, suportaram maior tempo de armazenamento a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Por outro lado, nos experimentos 3 e 4 com *M. anisopliae*, os melhores tratamentos foram as combinações de syloid com mel silvestre e leite desnatado. Esses dois últimos adjuvantes podem ser responsáveis pelo incremento de tolerância de *M. anisopliae* na temperatura de 30°C , a exemplo do que verificaram McCLATCHIE et al., 1993, com relação ao ajuste de nutrientes no meio de cultura para *M. flavoviride*.

4.5. Viabilidades de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* nas formulações com óleos na segunda fase da pesquisa

Experimento 1. Efeito da temperatura sobre formulações com conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleos

As viabilidades médias dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleos, armazenados a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de 270 dias, constam da Tabela 11 e estão apresentados na Figura 2.

Conforme se observa na Tabela 11, aos 90 dias de armazenamento, o óleo de girassol manteve a viabilidade de *B. bassiana* e causou uma redução de apenas 10% em *M. anisopliae*. O óleo mineral apresentou um efeito prejudicial aos fungos, sobretudo a *M. anisopliae*, fato este evidenciado desde os 60 dias. Decorridos 180 dias, os melhores tratamentos foram *B. bassiana* (conídios) e *B. bassiana* com óleo de girassol, não diferindo entre si, seguidos pelo tratamento *M. anisopliae* (conídios).

Aos 270 dias de armazenamento a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, as formulações de *B. bassiana* em óleo de girassol mantiveram 87% de viabilidade e o tratamento com conídios puros, apenas 47%.

Tabela 11. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleos.
Temperatura de 20±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento ⁽¹⁾										
	30	60	90	120	150	180	210	240	270		
Bb + OVG	100a*	100a	100a	90a	90b	90a	90a	90a	87a		
Bb (conídios)	100a	100a	100a	95a	95a	90a	90a	80b	47b		
Ma (conídios)	98a	90b	80c	70b	70c	63b	63b	63c	47b		
Ma + OVG	100a	100a	90b	40c	40d	20c	1c	0	0c		
Bb + OMNE	100a	60c	20d	0d	0e	0d	0c	0	0c		
Ma + OMNE	100a	5d	5e	0d	0e	0d	0c	0	0c		

⁽¹⁾ Até 30 dias todos os tratamentos estavam com 100% de viabilidade.

Bb - *B. bassiana*

Ma - *M. anisopliae*

OVG - óleo de girassol

OMNE - óleo mineral não emulsionável

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

Figura 2. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleos. Temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Com relação ao retardamento na germinação dos fungos em função do período de armazenagem, formulação e temperatura, foi observado que até aos 30 dias, todas as formulações alcançaram o máximo de germinação com 24 horas de incubação (Tabela 11).

Nas Tabelas 12 e 13 são apresentadas as viabilidades médias dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $30 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente e os melhores tratamentos constam das Figuras 3 e 4.

No armazenamento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, decorridos 60 dias, as formulações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* com óleo

mineral estavam inviáveis. A formulação *B. bassiana* com óleo de girassol, foi a melhor e manteve uma viabilidade de 80% até os 210 dias de armazenamento, apresentando 30% de viabilidade até aos 270 dias (Tabela 12, Figura 3).

Os tratamentos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (conídios) e a formulação *M. anisopliae* com óleo de girassol, aos 90 dias de armazenamento estavam com viabilidade de 80, 50 e 40% respectivamente, sendo que aos 120 dias, *B. bassiana* (conídios) ainda manteve 10% de viabilidade, enquanto os demais tornaram-se inviáveis.

Nessa temperatura observou-se que aos 90 dias de armazenamento ocorreu retardamento na germinação do tratamento *B. bassiana* e *M. anisopliae* (conídios) e *B. bassiana* e *M. anisopliae* com óleo de girassol, em relação a 24 e 48 horas de incubação, não havendo diferença entre 48 e 72 horas (Figura 5). Entretanto, com relação a formulação de *B. bassiana* com óleo de girassol, houve diferença entre 48 e 72 horas, a partir de 240 dias (Figura 6).

Tabela 12. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleos.
Temperatura de 25±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento ⁽¹⁾									
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	
Bb + OVG	100a*	98a	80a	80a	80a	80a	80a	50a	30a	
Bb (conídios)	100a	90b	80a	10b	1b	0b	0b	0b	0b	
Ma (conídios)	98a	90b	50b	1c	0b	0b	0b	0b	0b	
Ma + OVG	100a	95ab	40c	0c	0b	0b	0b	0b	0b	
Bb + OMNE	100a	0c	0d	0c	0b	0b	0b	0b	0b	
Ma + OMNE	100a	0c	0d	0c	0b	0b	0b	0b	0b	

⁽¹⁾ Até 30 dias todos os tratamentos estavam com 100% de viabilidade.

Bb - *B. bassiana*

Ma - *M. anisopliae*

OVG - óleo de girassol

OMNE - óleo mineral não emulsionável

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

Tabela 13. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em óleos.
Temperatura de 30±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento						
	8	15	30	60	90	120	150
Bb + OVG	100	100a*	95ab	95a	80a	30a	20a
Bb (conídios)	100	100a	100a	2b	0b	0b	0b
Ma (conídios)	100	100a	98a	0b	0b	0b	0b
Ma + OVG	100	100a	90b	0b	0b	0b	0b
Bb + OMNE	100	80b	0c	0b	0b	0b	0b
Ma + OMNE	100	70c	0c	0b	0b	0b	0b

Bb - *B. bassiana*

Ma - *M. anisopliae*

OVG - óleo de girassol

OMNE - óleo mineral não emulsionável

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

Figura 3. Viabilidades médias (%) de conídios de *M.anisopliae* e *B. bassiana* em óleos. Temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Figura 4. Viabilidades médias (%) de conídios de *M.anisopliae* e *B. bassiana* em óleos. Temperatura de $30\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Figura 5. Viabilidades médias (%) de conídios de *M.anisopliae* e *B. bassiana* formulados em óleos aos 90 dias de armazenamento. Temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Figura 6. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* formulado em óleo de girassol. Temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

No armazenamento a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ a formulação *B. bassiana* com óleo de girassol, manteve 80% de viabilidade até aos 90 dias de armazenamento. Após esse período de viabilidade decresceu para 20% aos 150 dias. A formulação de *M. anisopliae* com óleo de girassol manteve 90% de viabilidade aos 30 dias e àquelas com óleo mineral tornaram-se inviáveis. Aos 60 dias de armazenamento, os demais tratamentos também tornaram-se inviáveis (Tabela 13).

Aos 60 dias de armazenamento, manteve-se com viabilidade apenas o tratamento *B. bassiana* com óleo de girassol e *B. bassiana* (conídios) (Tabela 13). Com relação a melhor formulação, *B. bassiana* com óleo de girassol, teve a viabilidade influenciada pelo tempo de incubação a partir de 90 dias, a exemplo do que ocorreu na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Tabela 6).

Os resultados demonstraram que a melhor formulação foi *B. bassiana* com óleo de girassol. Até 30 dias de armazenamento os tratamentos alcançaram o máximo de germinação com 24 horas de incubação (Tabela 11 e 12) e a partir daí torna-se necessário uma leitura com 48 horas, sendo dispensável leituras com 72 horas, até o período de 210 dias (Figura 6).

Os resultados de viabilidade com *M. anisopliae* em óleo de girassol aos 20 e $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, foram melhores do que os obtidos por DAOUST et al. (1983), que trabalhando com 19 e 26°C , registraram aos 60 dias, 16 e 0%, respectivamente para

a viabilidade dos conídios. Com óleo mineral, os resultados desses autores estão de acordo com os verificados nestas pesquisas.

A formulação de *B. bassiana* com óleo de girassol, manteve 80% de viabilidade aos 90 dias, submetidas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% aos 210 dias a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 87% aos 270 dias armazenado a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Estes valores, devem ser atribuídos ao efeito benéfico do óleo, aliado a baixa umidade do fungo por ocasião da mistura, conforme indicam os trabalhos de McCLATICHIE et al. (1993) e MOORE et al. (1993).

4.6. Patogenicidade de conídios de *B. bassiana* e

M. anisopliae formulados em óleos, para

D. saccharalis em laboratório

A patogenicidade das formulações foram avaliadas após as suas preparações e aos cinco e oito meses de armazenamento, sendo que os bioensaios efetuados aos 5 e 8 meses, abrangeram apenas as formulações que apresentavam 50% ou mais de viabilidade de conídios.

Os resultados dos bioensaios com *D. saccharalis*, pulverizados com uma suspensão 10^8 conídios/ml das formulações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em óleos logo após as preparações e decorridos 5 e 8 meses de armazenamento, encontra-se nas tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a diferentes formulações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em óleos após as preparações. Temperatura de incubação $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
Ma + OMNE	100	84	3,67 (2,74 - 4,92)
Bb + OMNE	100	78	4,66 (3,55 - 6,13)
Ma + OVG	100	82	4,99 (4,09 - 6,09)
Bb + OVG	100	78	5,54 (4,60 - 6,68)
Ma + OVG + Em	100	82	4,28 (3,25 - 4,35)
Bb + OVG + Em	100	80	3,70 (2,53 - 5,41)
Ma conídios	100	78	3,70 (2,53 - 5,41)
Bb conídios	100	92	3,02 (2,04 - 4,49)
Ma - <i>M. anisopliae</i> OMNE - Óleo mineral não emulsionável Bb - <i>B. bassiana</i> OVG - Óleo de girassol Em - Emulsificante			

De acordo com os resultados, o tratamento com menor TL₅₀ foi *B. bassiana* (conídios), seguido por *M. anisopliae* mais óleo mineral não emulsionável, sendo que *B. bassiana* mais óleo de girassol apresentou o maior TL₅₀.

Tabela 15. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a formulações de *B. bassiana* em óleo de girassol após 5 meses de armazenamento. Temperatura de incubação $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
Bb + OVG/20°C	90	80	5,98 (4,82 - 7,43)
Bb + OVG/25°C	80	68	6,67 (5,79 - 7,69)
Bb (conídios) freezer	100	96	3,86 (3,10 - 4,81)

Bb - *B. bassiana*

OVG - Óleo de girassol

Comparando-se os tempos letais da formulação *B. bassiana* com óleo de girassol (20°C) e o fungo armazenado em freezer, observa-se que apesar do tempo letal ter sido maior para a formulação, a percentagem de mortalidade ocasionada por esta também foi elevada (80%), indicando que a virulência do patógeno após 5 meses de armazenamento (Tabela 15) não foi reduzida significativamente.

No bioensaio realizado após 8 meses de armazenamento, o fungo formulado em óleo de girassol também provocou uma menor mortalidade de *D. saccharalis*, quando

comparada com o fungo armazenado no freezer (Tabela 16), provavelmente devido a redução de virulência, após esse período.

Tabela 16. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a formulações de *B. bassiana* em óleo de girassol após 8 meses de armazenamento. Temperatura de incubação $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
Bb + OVG/20°C	90	62	7,31 (5,86 - 9,12)
Bb + OVG/25°C	50	52	9,40 (8,92 - 9,91)
Bb (conídios) freezer	100	92	3,97 (3,35 - 4,71)

Bb - *B. bassiana*

OVG - Óleo de girassol

4.7. Viabilidade de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis na segunda fase da pesquisa

Experimento 2. Efeito da temperatura sobre formulações pós molháveis de conídios de *M. anisopliae*

As viabilidades médias dos conídios de *M. anisopliae* das formulações armazenadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, estão na Tabela 17 e a representação gráfica do desempenho dos melhores tratamentos encontram-se na Figura 7.

Após 30 dias de armazenamento, o tratamento *M. anisopliae* (conídios) e as formulações 2, 3, 4 e 5 apresentavam 95% de germinação e as formulações 6, 7, 8, 9, 10 e 11 estavam apenas com 50% de viabilidade de conídios, enquanto que os tratamentos 12, 13 e 14 encontravam-se inviáveis. Aos 180 dias de armazenamento, o tratamento *M. anisopliae* (conídios) e formulações com lactose, lactose mais syloid e lactose mais amido de arroz, estavam com mais de 50% de viabilidade, sendo que a formulação conídios mais lactose, apresentava 70% de viabilidade, seguida de *M. anisopliae* (conídios) (Tabela 17). Esses resultados estão de acordo com DAOUST et al., 1983, que trabalhando com formulações contendo 20% de conídios de *M. anisopliae*, verificaram que a 20°C a viabilidade decresceu para 80% após 6 meses de armazenamento. Decorridos 240 dias, a formulação com lactose mais syloid manteve 50% de viabilidade e os conídios puros 63%.

Tabela 17. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisodliae* em formulações pós molháveis. Temperatura de 20±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento											
		8	30	60	90	120	150	180	210	240	270		
1. Ma (conídios)	100	98ab	98a	90a	80a	70a	70a	63ab	63a	63a	47a		
2. Ma + LC SYL	100	95ab	95a	90a	70b	70a	70a	57b	50b	50b	40a		
3. Ma + ARR	100	100a	95a	70b	60c	60b	50b	50c	30c	30d	1c		
4. Ma + LC	98	95ab	95a	90a	70b	70a	70a	70a	50b	40c	1c		
5. Ma + LC AR	98	95ab	95a	90a	70b	70a	70a	60b	50b	20e	10b		
6. Ma + Dx	95	90b	50b	50c	20d	1c	0c	0d	0d	0f	0d		
7. Ma + MSI	95	80c	50b	10e	0e	0c	0c	0d	0d	0f	0d		
8. Ma + MEU	95	80c	50b	5ef	1e	0c	0c	0d	0d	0f	0d		
9. Ma + MSI AR	95	80c	50b	1f	0e	0c	0c	0d	0d	0f	0f		
10. Ma + MEU AR	95	80c	50b	10e	1e	0c	0c	0d	0d	0f	0d		
11. Ma + Dx AR	80	60d	50b	30d	-	-	-	-	-	-	-		
12. Ma + Dx SYL	80	50e	0c	-	-	-	-	-	-	-	-		
13. Ma + MSI SYL	95	50e	0c	-	-	-	-	-	-	-	-		
14. Ma + MEU SYL	95	50e	0c	-	-	-	-	-	-	-	-		

Ma - *M. anisodliae*
 AR - Creme de arroz
 MSI - Mel silvestre
 SYL - Syloid
 ARR - Arroz do meio de cultura
 LC - Lactose
 MEU - Mel de eucalipto

AN/A - Antes do armazenamento, não incluído na análise estatística.

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

Com relação ao retardamento na germinação, verificou-se que a partir de 60 dias, a germinação dos conídios puros e formulados com lactose mais syloid foram influenciadas pelo tempo de incubação, entre 24, 48 e 72 horas, sendo evidenciado a partir de 90 dias de armazenamento (Figuras 8 e 9).

Figura 7. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis. Temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Figura 8. Viabilidades medias (%) de conídios puros de *M. anisopliae*. Temperatura de $20\pm1^{\circ}\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Figura 9. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* formulado com lactose mais syloid. Temperatura de $20\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

As viabilidades médias dos conídios de *M. anisopliae* das formulações armazenadas nas temperaturas de 25 e $30 \pm 1^\circ\text{C}$, estão apresentadas nas Tabelas 18 e 19 e as melhores formulações nas Figuras 10 e 12.

Decorridos 30 dias de armazenamento, o tratamento *M. anisopliae* (conídios) e todas as formulações com lactose, foram as melhores, com viabilidade de 95 a 98%. Aos 90 dias, esses tratamentos ainda apresentavam 50% de viabilidade. Por outro lado, aos 150 dias praticamente todas as formulações estavam inviáveis (Tabela 18), excetuando-se as formulações com lactose e syloid e com amido de arroz, apresentando 7 e 10% de viabilidade, respectivamente.

Para as melhores formulações a partir de 90 dias os conídios utilizados nessas formulações apresentavam também um acentuado efeito de retardamento de germinação (Figura 11).

Na temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, aos 30 dias de armazenamento, apenas os tratamentos conídios com lactose mais amido de arroz, *M. anisopliae* (conídios) e conídios com lactose mais syloid, apresentavam viabilidade igual ou superior a 50% e os demais, em sua maioria, estavam inviáveis. Aos 60 dias, apenas a formulação lactose mais amido de arroz estava com 10% de viabilidade (Tabela 19).

Tabela 18. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis. Temperatura de 25±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento					
		8	30	60	90	120	150
1. Ma (conídios)	100	98a	98a	90a	50a	1b	0b
2. Ma + LC SYL	100	95a	95a	90a	50a	7ab	7ab
3. Ma + ARR	100	100a	70b	70b	20b	0b	0b
4. Ma + LC	98	95a	95a	90a	50a	7ab	0.7b
5. Ma + LC AR	98	95a	95a	90a	50a	10a	10a
6. Ma + Dx	95	50c	50c	1c	0c	0b	0b
7. Ma + MSI	98	80b	40d	0c	0c	0b	0b
8. Ma + MEU	95	80b	40d	0c	0c	0b	0b
9. Ma + MSI AR	95	80b	30e	0c	0c	0b	0b
10. Ma + MEU AR	95	80b	40d	0c	0c	0b	0b
11. Ma + Dx AR	80	50c	50c	0c	0c	0b	0b
12. Ma + Dx SYL	80	0e	-	-	-	-	-
13. Ma + MSI SYL	95	30d	0	-	-	-	-
14. Ma + MEU SYL	95	50c	0	-	-	-	-

Ma - *M. anisopliae*

AR - Creme de arroz

MSI - Mel silvestre

SYL - Syloid

ARR - Arroz do meio de cultura

LC - Lactose

MEU - Mel de eucalipto

Dx - Dextrose

AN/A - Antes do armazenamento, não incluído na análise estatística.

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

Figura 10. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis. Temperatura de $25 \pm 12^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Figura 11. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis aos 90 dias de armazenamento. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Tabela 19. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis. Temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento		
		8	30	60
1. Ma (conídios)	100	98 ab	60 b	0 b
2. Ma + LC SYL	100	90 b	50 c	0 b
3. Ma + ARR	100	100 a	30 e	0 b
4. Ma + LC	98	95 ab	40 d	0 b
5. Ma + LC AR	98	90 b	70 a	10 a
6. Ma + Dx	95	50 c	0 f	0 b
7. Ma + MSI	98	50 c	0 f	0 b
8. Ma + MEU	95	50 c	0 f	0 b
9. Ma + MSI AR	95	50 c	0 f	0 b
10. Ma + MEU AR	95	50 c	0 f	0 b
11. Ma + Dx AR	80	50 c	0 f	0 b
12. Ma + Dx SYL	80	0 d	-	-
13. Ma + MSI SYL	95	0 d	-	-
14. Ma + MEU SYL	95	0 d	-	-

Ma - *M. anisopliae*

LC - Lactose

MSI - Mel silvestre

ARR - Arroz no meio de
cultura

Dx - Dextrose

MEU - Mel eucalipto

SYL - Syloid

AR - Creme de arroz

AN/N - Antes do armazenamento, não incluído na análise estatística.

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 12. Viabilidades médias (%) de conídios de *M. anisopliae* em formulações pós molháveis. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

A perda de viabilidade de conídios de *M. anisopliae* quando armazenados em temperatura superior a 21°C por mais de 75 dias, foi constatada por WALSTAD et al. (1970), ABREU et al. (1983) e BASTOS CRUZ et al. (1985).

As melhores formulações foram *M. anisopliae* (conídios) e as combinações desse fungo com lactose, syloid e amido de arroz (Tabelas 17, 18 e 19). O melhor adjuvante foi a lactose, conforme verificado nas combinações referidas anteriormente.

4.8. Patogenicidade de formulações pós molháveis

com conídios de *M. anisopliae* para *D. saccharalis*
em laboratório

Os resultados dos bioensaios com *D. saccharalis* logo após as preparações com *M. anisopliae* e decorridos 5 e 8 meses de armazenamento, estão nas Tabelas 20, 21 e 22.

O processo de formulação dos conídios de *M. anisopliae* não interferiu significativamente na virulência do patógeno para a maioria dos tratamentos, conforme pode ser observado pelos intervalos de confiança na Tabela 20.

Tabela 20. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de *M. anisopliae*, após a preparação. Temperatura de incubação $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
1. Ma + ARR	100	84	4,59 (3,98 - 5,30)
2. Ma + (conídios)	100	90	4,57 (3,51 - 5,95)
3. Ma + Dx	95	86	5,04 (4,38 - 5,80)
4. Ma + LC	98	82	4,25 (3,71 - 4,85)
5. Ma + Dx SYL	80	80	5,34 (4,56 - 6,25)
6. Ma + Dx AR	80	72	6,70 (5,89 - 7,62)
7. Ma + LC SYL	98	78	5,31 (4,63 - 6,10)
8. Ma + LC AR	98	88	4,35 (3,62 - 5,21)
9. Ma + MSI	98	84	5,22 (4,74 - 5,75)
10. Ma + MEU	95	90	4,13 (3,64 - 4,69)
11. Ma + MSI SYL	95	90	5,22 (4,76 - 5,73)
12. Ma + MSI AR	95	82	4,97 (4,52 - 5,47)
13. Ma + MEU SYL	95	84	4,30 (3,91 - 4,72)
14. Ma + MEU AR	95	84	4,24 (3,70 - 4,85)

Ma - *M. anisopliae*

ARR - Arroz no meio de cultura

AR - Creme de arroz

MSI - Mel silvestre

LC - Lactose

Dx - Dextrose

SYL - Syloid

MEU - Mel de eucalipto

O tratamento *M. anisopliae* (conídios) causou 90% de mortalidade de *D. saccharalis* (TL₅₀ = 4.57), valor semelhante aos outros tempos letais obtidos para as demais formulações, conforme intervalos de confiança, excetuando-se aquelas com dextrose mais syloid, dextrose mais amido de arroz e lactose mais syloid, demonstrando que as demais preparações não interferiram na virulência do fungo.

No resultado do bioensaio realizado após 5 meses de armazenamento, pode-se verificar que as mortalidades totais provocadas pelas formulações foram menores que as mortalidades causadas pelo fungo armazenado puro e proveniente do freezer (Tabela 21).

Tabela 21. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de *M. anisopliae*, após 5 meses de armazenamento a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Temperatura de incubação $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
Ma + (conídios)	80	86	5,50 (4,86 - 6,22)
Ma + LC	60	62	6,27 (5,25 - 7,48)
Ma + LC SYL	60	66	5,58 (4,48 - 6,96)
Ma + LC AR	60	72	6,59 (6,11 - 7,12)
Ma (conídios) freezer	98	84	4,70 (4,06 - 5,45)

Ma - *M. anisopliae*

LC - Lactose

SYL - Syloid

AR - Creme de arroz

No bioensaio realizado após 8 meses de armazenamento a formulação *M. anisopliae* mais lactose com syloid e o tratamento *M. anisopliae* (conídios) causaram menor mortalidade total em *D. saccharalis*, sendo menos eficientes que o fungo armazenado no freezer (Tabela 22). Por outro lado, DAoust et al., 1982, verificaram que após 8 meses de armazenamento a 20°C, preparações com *M. anisopliae*, tiveram a TL_{50} aumentadas de 2,5 para mais de 6 dias, o que está próximo ao observado nesta pesquisa.

Tabela 22. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a formulações pós molháveis de conídios de *M. anisopliae*, após 8 meses de armazenamento a 20±1°C. Temperatura de incubação 26±1°C e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL_{50} (dias)
Ma (conídios)	80	74	6.01 (5.54 - 6.53)
Ma LC SYL	60	74	6.55 (5.95 - 7.20)
Ma (conídios) freezer	98	86	4.82 (4.41 - 5.28)

Ma - *M. anisopliae*

LC - Lactose

SYL - Syloid

4.9. Viabilidades de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis na segunda fase da pesquisa

Experimento 3. Efeito da temperatura sobre formulações pós molháveis de conídios de *B. bassiana*

As viabilidades médias dos conídios de *B. bassiana* das formulações armazenadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, encontram-se na Tabela 23 e as melhores formulações foram representadas na Figura 13.

Excetuando-se os tratamentos com syloid mais dextrose, mel silvestre e mel de eucalipto, respectivamente 12, 13 e 14, que encontravam-se inviáveis, as demais formulações apresentavam 100% de viabilidade até 90 dias de armazenamento. Aos 180 dias, o tratamento *B. bassiana* (conídios) e conídios mais arroz do meio de cultura, mantinham 95% de viabilidade, e as formulações com lactose mais syloid e amido de arroz estavam com 60 e 53% de viabilidade, respectivamente. Decorridos 240 dias o tratamento *B. bassiana* (conídios) e conídios mais arroz do meio de cultura, ainda mantinham 80% de viabilidade (Tabela 23) e aos 270 dias o melhor tratamento foi conídios mais arroz no meio de cultura, com 60% de viabilidade.

Tabela 23. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis. Temperatura de 20±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento									
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	
1. Bb (conídios)	100a	100a	100a	95a	95a	95a	90a	80a	47b	
2. Bb + ARR	100a	100a	100a	95a	95a	95a	95a	80a	60a	
3. Bb + LC SYL	100a	100a	100a	70b	60b	60b	50b	40b	1c	
4. Bb + LC AR	100a	100a	100a	77b	60b	53bc	40c	40b	1c	
5. Bb + LC	100a	100a	100a	53cd	50c	50c	20e	7c	1c	
6/ Bb + Dx AR	100a	100a	100a	60c	50c	50c	20e	1c	0c	
7. Bb + Dx	100a	100a	100a	50d	50c	50c	20e	2c	0c	
8. Bb + MEU AR	100a	100a	100a	60c	50c	40d	30d	1c	0c	
9. Bb + MEU	100a	100a	100a	50d	50c	17f	5f	0c	0c	
10. Bb + MSI AR	100a	100a	100a	50d	50c	30e	10f	2c	0c	
11. Bb + MSI	100a	100a	100a	40e	40d	13f	5f	0c	0c	
12. Bb + Dx SYL	100a	0c	0b	-	-	-	-	-	-	
13. Bb + MSI SYL	100a	100a	0b	-	-	-	-	-	-	
14. Bb + MEU SYL	100a	30b	0b	-	-	-	-	-	-	

Bb - *B. bassiana* ARR - Arroz do meio de cultura

AR - Creme de arroz LC - Lactose

MSI - Mel silvestre MEU - Mel de eucalipto

SYL - Syloid DX - Dextrose

AN/A - Antes do armazenamento, não incluído na análise estatística.

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

Figura 13. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis. Temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Com relação ao retardamento da germinação dos conídios, foi verificado que na formulação com lactose mais syloid a partir de 120 dias, houve necessidade de se aumentar o tempo de incubação para que os mesmos atingissem o máximo de viabilidade e a partir de 210 dias no tratamento *B. bassiana* (conídios) (Figuras 14 e 15).

Figura 14. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* formulado com lactose mais syloid. Temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Figura 15. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana*. Temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

As viabilidades médias dos conídios de *B. bassiana* das formulações armazenadas nas temperaturas de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, estão nas Tabelas 24 e 25 e os melhores tratamentos representados nas Figuras 16 e 18.

Conforme se observa na Tabela 24, até 30 dias de armazenamento a maioria das formulações apresentou 100% de viabilidade, com exceção dos tratamentos com syloid que registravam de 0 a 63% de germinação. Aos 90 dias, *B. bassiana* (conídios) ainda mantinha 80% de viabilidade, seguido do tratamento lactose mais amido de arroz, com 60% de viabilidade. Aos 120 e 150 dias de armazenamento, apenas o tratamento conídios puros mantinha 10 e 5% de viabilidade, respectivamente.

A germinação dos conídios foi retardada aos 90 dias de armazenamento, no entanto não houve variação expressiva de 48 para 72 horas, conforme pode ser observado na Figura 17.

Na temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Tabela 25), aos 30 dias de armazenamento, alguns tratamentos já apresentavam-se inviáveis, enquanto que *B. bassiana* (conídios), *B. bassiana* com lactose mais amido de arroz, dextrose com amido de arroz e mel silvestre mais amido de arroz, estavam com mais de 90% de viabilidade. Decorridos 60 dias, todas as formulações já se encontravam praticamente inviáveis, estando os tratamentos 6 e 8 com apenas 5% de viabilidade.

Os melhores tratamentos dessa etapa foram obtidos a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ com *B. bassiana* (conídios), com meio de cultura (arroz). Esses resultados, aproximam-se dos encontrados por ZHANG et al., 1992, quando verificaram que a viabilidade de conídios puros de *B. bassiana*, não diferiram significativamente da melhor formulação pó molhável, após 8 meses de armazenamento, à temperatura de $10-20^{\circ}\text{C}$.

Tabela 24. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis. Temperatura de 25±1°C e 12 horas de fotofase.

Formulações	Dias de armazenamento					
	8	30	60	90	120	150
1. Bb (conídios)	100	100a*	90a	80a	10a	5a
2. Bb + ARR	100	100a	95a	20e	4ab	0a
3. Bb + LC SYL	100	63b	0d	0g	0b	0a
4. Bb + LC AR	100	100a	80b	60b	1ab	0a
5. Bb + LC	100	100a	70c	40d	0b	0a
6. Bb + Dx AR	100	100a	90a	50c	1ab	0a
7. BB + Dx	100	100a	80b	50c	0b	0a
8. Bb + MEU AR	100	100a	80b	50c	1ab	0a
9. Bb + MEU	100	100a	80b	40d	0b	0a
10. Bb + MSI AR	100	100a	70c	40d	1ab	0a
11. Bb + MSI	100	100a	65c	10f	0b	0a
12. Bb + Dx SYL	100	30c	0d	-	-	0a
13. Bb + MSI SYL	100	33c	0d	-	-	0a
14. Bb + MEU SYL	100	0d	-	-	-	-

Bb - *B. bassiana*

Dx - Dextrose

ARR - Arroz no meio de cultura

SYL - Sylloid

AR - Creme de arroz

MSI - Mel silvestre

LC - Lactose

MEU - Mel de eucalipto

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

Tabela 25. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	Dias de armazenamento		
	8	30	60
1. BB (conídios)	100	100 a*	2 a
2. Bb + ARR	100	50 e	0 a
3. Bb + LC SYL	100	0 f	0 a
4. Bb + LC AR	100	95 ab	0 a
5. Bb + LC	100	50 e	0 a
6. Bb + Dx AR	100	93 ab	5 a
7. Bb + Dx	100	90 bc	1 a
8. Bb + MEU AR	100	82 c	5 a
9. Bb + MEU	100	60 d	0 a
10. Bb + MSI AR	100	95 ab	3 a
11. Bb + MSI	100	60 d	0 a
12. Bb + Dx SYL	100	0 f	-
13. Bb + MSI SYL	100	0 f	-
14. Bb + MEU SYL	100	0 f	-

Bb - *B. bassiana*

LC - Lactose

ARR - Arroz no meio de cultura

MSI - Mel silvestre

MEU - Mel de eucalipto

Dx - Dextrose

AR - Creme de arroz

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 16. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis. Temperatura de $25\pm 1^\circ$ e fotofase de 12 horas.

Figura 17. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis aos 90 dias de armazenamento. Temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, incubação de 24, 48 e 72 horas em $26\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Figura 18. Viabilidades médias (%) de conídios de *B. bassiana* em formulações pós molháveis. Temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

A melhor performance do tratamento conídios de *B. bassiana* mais arroz do meio de cultura à 20°C , deve ser atribuída a umidade relativamente baixa do meio e desidratação lenta dos conídios, obtidos durante a secagem nas bandejas de produção, bem como ao próprio meio de cultura utilizado servindo como nutriente e, provavelmente, devido a relação entre volume de arroz/conídios, que é aproximadamente 10:1.

Dos adjuvantes utilizados, a exemplo de *M. anisopliae*, o melhor foi lactose, seguido de dextrose.

Os resultados favoráveis obtidos na temperatura de 30°C com a formulação de *M. anisopliae* e mel de abelha na primeira fase, não foram confirmados na segunda fase desta pesquisa.

Por outro lado, as soluções de açúcares e méis, aumentadas de 5 e 15% na primeira fase, para 30% na segunda, aparentemente não resultaram em melhoria para as formulações, conforme pode ser verificado em relação as viabilidades registradas na temperatura de 30°C nas fases iniciais deste estudo (item 4.3). Ao contrário, essa elevação de concentração pareceu contribuir para o efeito de retardamento na germinação dos conídios.

Desta forma é conveniente que em trabalhos futuros de formulações com esses fungos, seja reduzida a concentração dos adjuvantes nas diversas etapas envolvidas.

4.10. Patogenicidade de formulações pós molháveis com conídios de *B. bassiana* para *D. saccharalis* em laboratório

Os resultados dos bioensaios com *D. saccharalis* após as preparações de formulações pós molháveis com conídios de *B. bassiana* e decorridos 5 e 8 meses de armazenamento estão nas Tabelas 26, 27 e 28.

Tabela 26. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de *B. bassiana*, após a preparação. Temperatura de incubação de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
1. Bb + ARR	100	92	2,43 (1,66 - 3,54)
2. Bb (conídios)	100	90	2,27 (1,38 - 3,72)
3. Bb + DX	100	90	2,95 (2,00 - 4,37)
4. Bb + LC	100	86	3,09 (2,32 - 4,13)
5. Bb + Dx SYL	100	76	3,42 (2,29 - 5,11)
6. Bb + Dx AR	100	92	3,46 (2,32 - 5,16)
7. Bb + LC SYL	100	94	3,23 (2,39 - 4,36)
8. Bb + LC AR	100	94	3,17 (2,20 - 4,57)
9. Bb + MSI	100	84	3,41 (2,64 - 4,42)
10. Bb + MEU	100	92	3,79 (3,14 - 4,57)
11. Bb + MSI SYL	100	94	3,67 (2,93 - 4,61)
12. Bb + MSI AR	100	92	2,39 (1,55 - 3,67)
13. Bb + MEU SYL	100	90	3,60 (2,74 - 4,72)
14. Bb + MEU AR	100	92	3,39 (2,67 - 4,30)

Bb - *B. bassiana*

Dx - Dextrose

LC - Lactose

AR - Creme de arroz

SYL - Syloid

MSI - Mel silvestre

MEU - Mel de eucalipto

Os resultados indicam que excetuando-se o tratamento 5, não houve efeito adverso do processo de formulações sobre a patogenicidade do fungo (Tabela 26). No entanto, com relação ao TL₅₀, verificou-se um aumento na

maioria dos tratamentos, com exceção da formulação com mel silvestre mais amido de arroz.

No bioensaio realizado após 5 meses de armazenamento as formulações *B. bassiana* com dextrose, lactose e mel de eucalipto foram menos patogênicas para *D. saccharalis*, enquanto que o tratamento *B. bassiana* (conídios) e formulação com lactose mais syloid, apresentaram TL_{50} mais próximos daquele obtido para o fungo armazenado em freezer, ou seja, respectivamente 5,09 e 5,03, contra 3,86 dias desse último (Tabela 27). As mortalidades totais de *D. saccharalis* causadas pelas formulações armazenadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ foram menores que a ocasionada pelo fungo proveniente do freezer.

O bioensaio realizado após 8 meses também mostrou que o fungo proveniente do freezer causou maior mortalidade que as formulações armazenadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Esse resultado foi esperado já que houve uma perda de viabilidade dos conídios em função desse período de armazenamento, inclusive com as formulações apresentando 40% de viabilidade (Tabela 28), apesar de nem sempre a viabilidade estar relacionada com a virulência, conforme preconizaram McCOY & COUCH (1978).

Tabela 27. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de *B. bassiana* após 5 meses de armazenamento a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Temperatura de incubação $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
1. Bb + (Conídios)	80	78	5,09 (4,22 - 6,15)
2. Bb + Dx	50	56	7,74 (6,25 - 9,60)
3. Bb + LC	50	58	8,09 (7,23 - 9,06)
4. Bb + Dx AR	70	68	7,20 (6,16 - 8,42)
5. Bb + LC SYL	70	80	5,03 (4,66 - 5,45)
6. Bb + LC AR	70	64	5,67 (4,57 - 7,04)
7. Bb + Bb MEU	50	52	8,72 (7,09 - 10,72)
8. Bb + MSI AR	60	66	5,82 (4,74 - 7,15)
9. Bb + MEU AR	60	66	5,32 (4,37 - 6,48)
10. Bb (conídios) freezer	100	96	3,86 (3,10 - 4,81)

Bb - *B. bassiana*

Dx - Dextrose

LC - Lactose

AR - Creme de arroz

SYL - Syloid

MSI - Mel silvestre

MEU - Mel de eucalipto

Tabela 28. Mortalidade de *D. saccharalis* submetida a diferentes formulações pós molháveis de conídios de *B. bassiana*, após 8 meses de armazenamento a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Temperatura de incubação $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase.

Formulações	Viabilidade de conídios (%)	Mortalidade (%)	TL ₅₀ (dias)
Bb (conídios)	70	78	6,56 (6,04 - 7,13)
Bb + LC SYL	40	64	7,77 (7,15 - 8,46)
Bb + LC AR	40	52	8,62 (7,26 - 10,24)
Bb (conídios) freezer	100	92	3,97 (3,35 - 4,71)

Bb - *B. bassiana*

LC - Lactose

SYL - Syloid

AR - Creme de arroz

4.11. Correlação entre a viabilidade de conídios de *B. bassiana* e a mortalidade de lagartas de *D. saccharalis*

Com os valores de viabilidade de conídios de *B. bassiana* e mortalidade de *D. saccharalis*, expressos nas Tabelas 26, 27 e 28, efetuou-se uma análise de regressão linear. O modelo de regressão linear foi:

$$Y = 29,15 + 0,61X,$$

cujo coeficiente de determinação (R^2) foi de 88%.

Quando foram atribuídos valores à X na faixa de viabilidade ocorrida nesses bioensaios, verificou-se que para cada 1% de viabilidade, correspondeu aproximadamente 1% de mortalidade.

4.12. Formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Experimento 1. Ação da temperatura sobre formulações com micélios dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em laboratório

Os dados de esporulação dos micélios dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* formulados com alginato de sódio e amido de milho armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 120 dias, constam das Tabelas 29, 30 e 31.

Antes do armazenamento as preparações mais produtivas foram com alginato de sódio para ambos os fungos, seguidas de amido de milho para *B. bassiana* (Tabela 29).

Na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, aos 15 dias de armazenamento, as formulações anteriormente referidas, figuravam entre as três mais produtivas e aos 30 dias a formulação de *M. anisopliae* com alginato de sódio, já se apresentava inviável, acontecendo o mesmo com a preparação micélio seco, aos 60 dias. Nessa temperatura, ROMBACH et al. (1988), verificaram que após 2 semanas os micélios de *B. bassiana*, estavam inviáveis. Aos 90 dias de armazenamento, as formulações de *B. bassiana* com alginato e amido foram as

melhores, seguidas de micélio seco e por último a preparação com micélio de *M. anisopliae* mais amido de milho. Decorridos 120 dias, a formulação de *B. bassiana* com amido de milho estava com plena viabilidade, seguida da preparação micélio seco. Por outro lado, o volume de esporulação verificado na formulação de *B. bassiana* com alginato de sódio, pode ser atribuído em parte a percentagem de amido de milho contida na mesma. Este fato, está de acordo com KNUDSEN et al., 1990, que trabalhando com essa formulação, efetuou misturas com ou sem farelo de trigo, verificando resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Tabela 29. Número médio de conídios $\times 10^7$ produzidos por 23,75mm² de superfície de grânulos obtidos de formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Temperatura de 25±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento				
		15	30	60	90	120
<i>B. bassiana</i>						
Micélio seco	9.43bc*	8.27ab	9.40a	15.33ab	7.90bc	1.90b
Alg. de sódio	17.00a	10.87ab	3.20ab	18.00a	15.00a	0.00b
Amido de milho	12.00abc	13.67a	8.23a	11.00bc	14.33ab	10.90a
<i>M. anisopliae</i>						
Micélio seco	6.90c	5.80b	8.17a	0.00d	0.00d	0.00b
Alg. de sódio	15.00ab	13.33a	0.00b	0.00d	0.00d	0.00b
Amido de milho	7.30c	8.00ab	6.70a	5.20cd	5.27cd	0.00b

AN/A - Antes do armazenamento.

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A maior esporulação verificada em preparações de *B. bassiana* em datas subseqüentes de armazenamento, pode ser atribuída à desuniformidade no tamanho das amostras colocadas em BDA mais antibiótico ou por ocasião da coleta para quantificação de conídios.

Na temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, conforme observado na Tabela 30, aos 15 dias de armazenamento, a preparação micélio seco e formulações com *B. bassiana* foram mais produtivas do que as formulações com *M. anisopliae*, sendo que a preparação com alginato, tornou-se inviável. Aos 30 dias, os melhores tratamentos foram micélio seco e preparados com amido de milho e o fungo *B. bassiana*. Após esse período a preparação micélio seco de *M. anisopliae* se encontrava inviável. Aos 60 dias, as melhores formulações foram de *B. bassiana* com alginato e amido de milho, sendo que aos 90 dias de armazenamento, apenas este fungo com amido de milho, apresentava-se viável e com capacidade de produção de conídios, prolongado até aos 120 dias.

Aos 15 dias de armazenamento sob a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ a formulação com alginato e tratamento micélio seco de *M. anisopliae* já se apresentavam inviáveis. Por outro lado, todos os tratamentos com *B. bassiana* continuavam viáveis e com capacidade total de produção de conídios, conforme se observa na Tabela 31. Decorridos 30 dias, os melhores tratamentos foram *B. bassiana* com amido de milho e micélio seco. Com relação a este último, os resultados

Tabela 30. Número médio de conídios $\times 10^7$ produzidos por 23,75mm² de superfície de grânulos obtidos de formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Temperatura de 30 $\pm$ 1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento				
		15	30	60	90	120
<i>B. bassiana</i>						
Micélio seco	9,43bc*	14,60a	13,33a	8,97b	0,00b	0,00a
Alg. de sódio	17,00a	12,00ab	7,07bc	19,67a	0,00b	0,00a
Amido de milho	12,00abc	9,60bb	10,27ab	16,00ab	11,67a	0,30a
<i>M. anisopliae</i>						
Micélio seco	6,90c	4,33bc	0,00c	0,00c	0,00b	0,00a
Alg. de sódio	15,00ab	0,00c	0,00c	0,00c	0,00b	0,00a
Amido de milho	7,30c	5,53b	2,63c	3,27bc	0,00b	0,00a

AN/A - Antes do armazenamento.

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 31. Número médio de conídios $\times 10^7$ produzidos por 23,75mm² de superfície de grânulos obtidos de formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Temperatura de 35 $\pm$ 1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Dias de armazenamento			
		15	30	60	90
<i>B. bassiana</i>					
Micélio seco	9,43bc*	11,33ab	10,73ab	10,33a	0,00b
Alg. de sódio	17,00a	15,07a	8,69bc	0,00b	0,00b
Amido de milho	12,00abc	11,97a	16,33a	10,13a	7,43a
<i>M. anisopliae</i>					
Micélio seco	6,90c	0,00c	0,00d	0,00b	0,00b
Alg. de sódio	15,00ab	0,00c	0,00d	0,00b	0,00b
Amido de milho	7,30c	5,53bc	2,53cd	0,37b	0,00b

AN/A - Antes do armazenamento.

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

diferem de ROMBACH et al., 1988, que constatarem perda de viabilidade de micélio seco de *B. bassiana* após uma semana na temperatura de 35°C. Aos 60 dias de armazenamento, continuavam com viabilidade apenas esses dois últimos tratamentos e a formulação de amido de milho com *M. anisopliae*. Aos 90 dias, apenas a formulação de *B. bassiana* com amido de milho encontrava-se viável, tornando-se inviável aos 120 dias.

Esses resultados indicam que as preparações com micélio de *B. bassiana* foram as que produziram mais conídios em todas as situações e estão de acordo com os trabalhos de PEREIRA (1987) e PEREIRA & ROBERTS (1991).

Experimento 2. Esporulação de formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em campo

Nesse experimento foram registradas informações referentes à capacidade de esporulação das partículas dos fungos formulados, bem como à perda ocorrida sobre os mesmos, devido a predação e outros fatores.

Os resultados de esporulação (+), não esporulação (-), germinação (o) e perdas (*) das partículas fúngicas, estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Esporulação, germinação e perdas de partículas de micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em cana-de-açúcar e no solo. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas (Piracicaba, 1993).

Formulações	Condição	AN/A	Dias após o armazenamento			
			15	30	60	90
<i>B. bassiana</i>						
Micélio seco	Solo lab.	+++	+++	+++	+++	---
	Planta	+++	+++	---	---	--*
	Solo campo	+++	++*	+++	++*	--*
Alginato de sódio	Solo lab.	+++	+++	+++	+++	++-
	Planta	+++	+++	---o	*-*	++-
	Solo campo	+++	++*	+++	---*	++-
Amido de milho	Solo lab.	+++	+++	+++	+++	+++
	Planta	++-	---	---	---*	++-
	Solo campo	+++	++*	++*	---o	---*
<i>M. anisopliae</i>						
Micélio seco	Solo lab.	+++	---	---	---	---
	Planta	**-	---*	---	---	---
	Solo campo	+++	---*	---	---*	---
Alginato de sódio	Solo lab.	+++	---	---	---	---
	Planta	++-	---*	---	---*	---
	Solo campo	+++	---*	---o	-o*	---
Amido de milho	Solo lab.	+++	+++	+++	---	---
	Planta	++-	---	---	---	---
	Solo campo	+++	++-	---	---*	---

(+) Esporulação; (-) Não esporulação; (o) Germinação; (*) Perdas.
Os sinais convencionais, referem-se as três repetições.
AN/A - Antes do armazenamento.

Conforme se observa na Tabela 32, as partículas miceliais colocadas no solo e planta antes do armazenamento, tiveram esporulação normal em sua maioria, com exceção de algumas amostras colocadas na planta. Após 15 dias de armazenamento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, houve esporulação apenas para os tratamentos com *B. bassiana* e formulação de *M. anisopliae* com amido de milho colocadas no solo em laboratório e campo. Aos 30 dias, todos os tratamentos com *B. bassiana* colocados no solo em laboratório e no campo estavam esporulados, sendo que apenas uma amostra do micélio seco esporulou na planta. Com relação a *M. anisopliae*, só houve esporulação na formulação com amido de milho no solo em laboratório. Após 60 dias de armazenamento, nenhuma formulação com *M. anisopliae* esporulou e aos 90 dias, continuaram esporulando apenas as formulações de *B. bassiana* com alginato de sódio no solo em laboratório, campo e na planta e amido de milho no solo em laboratório e na planta. O excesso de umidade no solo e baixa temperatura no campo, ocorrido por ocasião da amostragem referente aos 60 dias de armazenamento, pode ter influenciado negativamente a esporulação do micélio de *M. anisopliae*, a exemplo do que verificaram KRUEGER et al., 1991.

Com relação a ocorrência de perdas de partículas miceliais, observou-se que de 168 amostras levadas ao campo, apenas 23 não foram recuperadas, correspondendo a 13,69% (Tabela 32). Essa perda portanto, não deve influenciar no desempenho dessas preparações a nível de campo e as

formulações com micélios representam mais uma forma em potencial para utilização desses fungos.

Esses resultados demonstram que *B. bassiana* é mais adequado para formulações com micélio seco, porque suporta melhor as condições do armazenamento e campo, concordando com os resultados de PEREIRA (1987).

Os resultados dessa pesquisa, indicam que as formulações de *B. bassiana*, devido ao seu desempenho e potencial devem ser melhor estudadas para utilização em formulações comerciais. Paralelamente, verificou-se que os tratamentos de *B. bassiana* (conídios puros) e conídios mais meio de cultura (arroz), mantidos a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, praticamente não reduziram a viabilidade até 180 dias, podendo-se sugerir esta forma de armazenamento, principalmente quando a produção desse fungo for direcionada para o atendimento de contratos específicos, com uso em tempo previsível, a exemplo do que preconizaram COUCH & IGNOFFO (1981).

Vale salientar que o estudo de formulações com fungos entomopatogênicos, especialmente com conídios, reveste-se de grande dificuldade, principalmente devido a instabilidade dos conídios desses microrganismos em relação a temperatura, umidade e substrato, dentre outros fatores. Essas dificuldades são inclusive reconhecidas e divulgadas entre os pesquisadores dessa área. Assim sendo, atenção especial deve ser dada à baixa umidade inicial dos conídios

por ocasião das formulações e armazenamento, e à concentração de diluentes e adjuvantes, para assegurar o estabelecimento de uma preparação que prolongue as qualidades desejáveis dos fungos entomopatogênicos, a fim de que possam ser utilizados de maneira racional no controle dos insetos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados dessa pesquisa, permitem concluir:

5.1. O óleo de girassol favorece a preservação de conídios de *B. bassiana* a 20°C, mantendo 90% de viabilidade por um período de 240 dias de armazenamento.

5.2. À temperatura de 20°C os conídios puros de *M. anisopliae* permanecem com viabilidade de 70% aos 150 dias de armazenamento e os de *B. bassiana* com 80% decorridos 240 dias.

5.3. As melhores formulações pós molháveis para manter a viabilidade são *M. anisopliae* com lactose e *B. bassiana* com lactose mais syloid.

5.4. O aumento da temperatura e do tempo de armazenamento provocam retardamento na germinação dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

5.5. O amido de milho pregelatinizado é mais adequado que o alginato de sódio para formulações com micélios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

5.6. O fungo *B. bassiana* é mais tolerante para diferentes formulações e tempo de armazenamento do que *M. anisopliae*, tanto na forma de conídios como na de micélio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HALIM, M.; EL-SAYED, M.; REHM, H.J. Morphology of *Penicillium chrysogenum* strains immobilized in calcium alginate beads and used in penicillin fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 24: 89-94, 1986.
- ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; CRUZ, R.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em função do período e condições de armazenamento. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 50(1/4): 57-63, 1983.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo. Manole, 1986. p.73-126.
- ALVES, S.B. Perspectiva para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 27: 77-86, 1992.
- ALVES, S.B. & PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. *Ecossistema*, Espírito Santo do Pinhal, 14: 188-92, 1989.

- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; PEREIRA, R.M.; MACEDO, N.
Estudo de formulações do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
Sorok. em diferentes condições de armazenamento.
Ecossistema, Espírito Santo do Pinhal, 12: 78-87, 1987.
- ANDERSCH, W. Production of fungi as crop protection agents.
Pflanzenchutz Naehrichten, Leverkusen, 45: 129-43, 1992.
- ANDERSCH, W.; HARTWIG, J.; REINECKE, P.; STENZEL, K.
Production of mycelial granules of the entomopatogenic
fungus *Metarhizium anisopliae* for biological control of
soil pests. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE
PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5.; ANNUAL MEETING OF THE
SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 23., Adelaide, 1990.
Proceedings and Abstracts. Adelaide, Society of
Invertebrate Pathology, 1990. p.403.
- ANGUS, T.A. & LUTHY. Formulation of microbial insecticides.
In: BURGESS, H.D. & RUSSEK, N.W., coord. *Microbial control
of insects and mites*. London, Academic Press, 1971.
p.623-38.
- AREGGER, E. Conidia production of the fungus *Beauveria
brongniartii* on Barley and quality evaluation during
storage at 2°C. *Journal of Invertebrate Pathology*, New
York, 59: 2-10, 1992.
- AUGUSTO, N.T.; BARRETO, H.B.F.; BEGOSSO, S.; MALAQUIAS, R.E.;
BARRETO, L.C.L. Avaliação de inertes. usados nas
formulações de defensivos agrícolas. *Arquivos do
Instituto Biológico*, São Paulo, 55: 11-7, 1988.

BASTOS CRUZ, B.P.; ABREU, O.C.; VALARINI, P.; OLIVEIRA, D.A.
Efeito da temperatura, tempo de armazenagem e do tipo de preparo sobre o poder germinativo de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, cultivado em arroz. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, 52(1/4): 45-57, 1985.

BATEMAN, R. Controlled droplet application of myco-insecticide: an environmental friendly way to control locusts. *Antenna*, London, 16(1): 6-13, 1992. Apud *Review of Agricultural Entomology*, Wallingford, 80(12): 1182, Dec. 1992a. (Resumo).

BATEMAN, R. Preparation, atomisation and activity of oil-and water-based deuteromycete conidial formulations. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 25., Heidelberg, 1992. Heidelberg, Society for Invertebrate Pathology, 1992b. p.266.

BATISTA FILHO, A. & CARDELLI, M.A. Viabilidade dos esporos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. isolados de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) obtidos em diferentes meios de cultura e armazenados a diferentes temperaturas. *Biológico*, São Paulo, 52(4/6): 57-9, 1986.

CLERK, T.C. & MADELIN, M.F. The longevity of three insect-parasiting hyphomycetes. *Transactions British Mycological Society*, Cambridge, 48(2): 193-209, 1965.

COUCH, T.L. & IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H.D. *Microbial control of pests and plant diseases*. London, Academic Press, 1981. cap. 34, p.621-34.

- CRANSTON, P.M. Alginic acid derivatives as a solidifying agent for microbiological nutrient suspension. *Food Technology in Australia*, Sydney, 35: 134-6, 1983.
- DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 41: 143-50, 1983a.
- DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 41: 161-70, 1983b.
- DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 40: 228-36, 1982.
- DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 41: 151-60, 1983.
- FARGUES, J.; ROBERT, P.H.; REISINGER, O. Formulation des productions de masse de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires. *Anales de Zoologie écologie Animale*, Paris, 11(2): 247-57, 1979.

FARGUES, J.; REISINGER, O.; ROBERT, P.H.; AUBART, C.
Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes:
influence of clay on *Beauveria bassiana* blastospores
survival in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, New
York, 41: 131-42, 1983.

FERRON, P. Biological control of insect pests by
entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, New
York, 23: 409-42, 1978.

FRAVEL, D.R.; MAROIS, J.J.; LUMSDEN, R.D.; CONNICK Jr., W.J.
Encapsulation of potential biocontrol agents in a alginate
- clay matrix. *Phytopathology*, St. Paul, 75(7): 774-7,
1985.

HARRISON, R.D.; McCOY, C.W.; SCHWARZ, M.R. Effects of
different abiotic factors on conidiation of *Metarhizium*
anisopliae mycelial granules in soils. In: ANNUAL MEETING
OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 26., Asheville.
1993. Asheville, Society for Invertebrate Pathology, 1993.
p.57.

HENSLEY, S.D. & HAMMOND, A.M. Laboratory technique for
rearing the sugar cane borer on an artificial diet.
Journal of Economic Entomology, Lanham, 61(6): 1742-43,
1968.

HUANG, J.S.; HE, Y.L.; LIN, R.Y. Use of a new paste
preparation of *Beauveria bassiana* in the forest to control
Zeuzera multistrigata (Lep., Cossidae). *Chinese Journal*
of Biological Control, Beijing, 6(3): 121-3, 1990. Apud
Review of Agricultural Entomology, Wallingford, 79(4):
456, Apr. 1991. (Resumo).

- KAWAKAMI, K. & MIKUNI, T. Effects of relative humidity and temperature on the viability of conidia of some muscardines. *Acta Sericologica*, Ibaraki, 56: 42-6, 1965.
- KNUDSEN, G.R.; JOHNSON, J.B.; ESCHEN, D.J. Alginate pellet formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi: Hypomycetes) isolate pathogenic to cereal aphids. *Journal of Economic Entomology*, Lanhan, 83(6): 2225-48, 1990.
- KRUEGER, S.R.; VILLANI, M.G.; MARTINS, S.A.; ROBERTS, D.W. Efficacy of soil applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin conidian, and standard and liophylized mycelial particles against scarab grubs. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 59(1): 54-60, 1992.
- KRUEGER, S.R.; VILLANI, M.G.; MYROP, J.P.; ROBERTS, D.W. Effect of soil environment on the efficacy of fungal pathogens against scarab grubs in laboratory bioassays. *Biological Control*, San Diego, 1(3): 203-9, 1991. Apud *Review of Agricultural Entomology*, Wallingford, 81(3): 258, 1993. (Resumo).
- KYBAL, J. & KALALOVA, S. Micological aspects of the production of the bioinsecticidal preparation boverol. *Rostlinna Vyroba*, Praha, 33(11): 1215-22, 1987. Apud *Review of Agricultural Entomology*, Wallingford, 78(7): 803, July 1990. (Resumo).
- LATGÉ, J.P. & MOLETTA, R. Biotechnology. In: SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LATGÉ, J.P. *Atlas entomopathogenic fungi*. Berlin, Springer-Verlag, 1988. cap. 6, p.152-64.

LEITE, L.G.; CAMARGO, L.M.P.C.A.; BATISTA FILHO, A.; WRASHIMA, A.S.; ASAYAMA, T.; LEITE, N.; VILELLA, O.; PRADA, W.L. Controle de adultos do gorgulho aquático do arroz pela aplicação da mistura do fungo *Beauveria bassiana* com óleo de soja, em campos irrigados. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal*, 21(1): 83-94, 1992.

MARQUES, E.J. Controle microbiano de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.: eficiência e limitações. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia, 1992. *Anais. Águas de Lindóia, EMBRAPA/CNPDA*, 1992. p.73-8.

MCCABE, D. & SOPER, R.S. Preparation of an entomopathogenic fungal insect control agent. Patente industrial (Estados Unidos) nº 4.530.834, 23 July, 1985.

McCLATCHIE, G.U.; MOORE, D.; PRIOR, C. Temperature effects of the viability of conidia the *Metarhizium flavoviride* in soil formulations. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 26., Asheville, 1993. Asheville. Society for Invertebrate Pathology, 1993. p.58.

MCCOY, C.W. & COUCH, T.L. *Hirsutella thompsonii*: a potential mycoacaricide. *Developments in Industrial Microbiology*, Amsterdam, 20: 89-96, 1978.

MCCOY, C.W.; HILL, A.J.; KANAVEL, R.F. Large-scale production of the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* in submerged culture and its formulation for application in the field. *Entomophaga, Paris*, 20(3): 229-40, 1975.

McCOY, C.W.; SANSON, R.A.; BOUCIAS, D.G. Entomogenous fungi. In: IGNOFFO, C.M., ed. **CRC handbook of natural pesticides**. Boca Raton, CRC Press, 1988. v. 5: Microbial Insecticides, pt. A: Entomogenous Protozoa and Fungi, p.151-236. (CRC Ser. in Naturally Occurring Pesticides).

McCOY, C.W.; FERGUSON, J.S.; TAYLOR, J.B.; STOREY, G.K. Performance of commercial formulation of *Beauveria bassiana* for the microbial control of neonatal larvae of citrus root weevils. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 25., Heidelberg, 1992. Heidelberg, Society for Invertebrate Pathology, 1992. p.286.

MILNER, R.J.; HUPPATZ, R.J.; SWARIS, S.C.A. New method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 57(1): 121-3, 1991.

MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, London, 7(1): 5-28, 1992.

MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; JENKINS, N.E.; LOMER, C.J. Long term storage of *Metarhizium flavoviride* formulated in oils for the control of locust and grasshoppers. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 26., Asheville, 1993. Asheville, Society for Invertebrate Pathology, 1993. p.59.

PEREIRA, R.M. Dry mycelium formulation of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, with inclusion of ultraviolet-radiation protectants. Ithaca, 1987. 98p. (M.S. - Cornell University).

- PEREIRA, R.M. & ROBERTS, D.W. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 56: 39-46, 1990.
- PEREIRA, R.M. & ROBERTS, D.W. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, 84(6): 1657-61, 1991.
- PRIOR, C. & JOLLANDS, P. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 52(1): 66-72, 1988.
- PRIOR, C.; MOORE, D.; BATEMAN, R.; ABRAHAN, Y.J. Myco-pesticides for locust and grasshopper control. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM IN INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5.; ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 23. Adelaide, 1990. *Proceedings and abstracts*. Adelaide, Society of Invertebrate Pathology, 1990. p.491.
- ROBERTS, D.W. & CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic fungi. *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*, Lanham, 10(3): 1-80, 1977.
- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; ROBERTS, D.W. Storing dry *Beauveria bassiana* mycelium. *International Rice Research Newsletter*, Manila, 13(6): 37-8, Dec. 1988.

ROMBACH, R.C.; AGUDA, R.M.; SHEPARD, B.M.; ROBERTS, D.W.
Infection of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*
(Homoptera: Delphacidae), by field application of entomo-
pathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environmental*
Entomology, Lanham, 15(5): 1070-3, 1986.

SOPER, R.S. & WARD, M.G. Production, formulation and
application of fungi for insect control. In: PAPAIVIZAS,
C.G., ed. *Biological control in crop production*.
Ottawa, Allanheld, Osmun Publ., 1981. p.161-80.

STARCOVÁ, H. & WEISER, J. Shelf life of boverol, the
formulation bioinsecticide with conidia of *Beauveria*
bassiana. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR
INVERTEBRATE PATHOLOGY, 25., Heidelberg. 1992.
Heidelberg, Society for Invertebrate Pathology, 1992.
p.228

STENZEL, K.; HÖLTERS, J.; ANDERSCH, W.; SMIT, T.A.M. Bio
1020: granular *Metarhizium* - a new product for biocontrol
of soil pests. In: BRIGTON CROP PROTECTION CONFERENCE,
PESTS AND DISEASES. Brighton, 1992. *Proceedings*. Farnham,
Royal, British Crop Protection Council, 1992. p.363-8.

STOREY, G.K.; GARDNER, W.A.; TOLLNER, E.W. Penetration and
persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana*
conidia in soil of two tillage systems. *Environmental*
Entomology, College Park, 18(5): 835-9, 1989.

STOREY, G.K.; MCCOY, C.W.; STENZEL, K.; ANDERSCH, W. Conidiation kinetics of the mycelial granules of *Metarhizium anisopliae* (Bio 1020) and its biological activity against different soil insects. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL. 5.; ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 23., Adelaide, 1990. **Proceedings and abstracts.** Adelaide, Society of Invertebrate Pathology, 1990. p.320-5.

VEEN, K.H. **Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae*, chez le criquet pelerin.** Wageningen, 1968. 77p. (Communication, 150).

VIDAL-TORRADO, P. & SPAROVEK, G. **Mapa pedológico detalhado do Campus "Luiz de Queiroz".** ESALQ/Depto. Solos, 1993. Ex. 1:10.000.

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: 221-6, 1970.

ZHANG, A.W.; LIU, W.Z.; NONG, X.Q.; DENG, C.S.; GUO, W.L.; JANG, B. A trial production of wattable powder of *Beauveria bassiana*. **Chinese Journal of Biological Control**, Beijing, 8(3): 118-20, 1992. Apud **Review of Agricultural Entomology**, Wallingford, 81(3): 256, Mar. 1993. (Resumo).

ZHANG, A.W.; LIU, W.Z.; DENG, C.S.; NONG, X.R.; WU, Z.K.; GNO, W.L.; JIANG, B.; WANG, S.F.; SONG, L.W.; CHEN, F. Field control of Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* (Lep., Pyralidae) with different preparations form of *Beauveria bassiana*. Chinese Journal of Biological Control, Beijing, 6(3): 118-20, 1990. Apud Review of Agricultural Entomology, Wallingford, 79(4): 416, Apr. 1991. (Resumo).

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 40(1): 36-40, 1982.

APEŃDICE

Tabela 33. Percentagens de unidade de formulações pós molháveis de conídios de *M. anisopliae*. Temperatura $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	Antes do armazenamento	Após perda de viabilidade
1. Conídios puros	31,3	20,5*
2. Conídios + Dx 5% (1)	32,9	25,0*
3. Conídios + Dx 15% (2)	30,5	22,3
4. Conídios + CAO Dx 1	5,2	9,5
5. Conídios + CAO Dx 2	8,5	12,5
6. Conídios + FIL Dx 1	5,2	10,5
7. Conídios + FIL Dx 2	12,4	15,2
8. Conídios + DIA Dx 1	9,9	9,9
9. Conídios + DIA Dx 2	13,0	15,7
10. Conídios + SYL Dx 1	21,1	18,6
11. Conídios + SYL Dx 2	19,0	15,4
12. Conídios + MAI Dx 1	9,4	13,4
13. Conídios + MAI Dx 2	10,4	15,0
14. Conídios puros	33,5	19,0*
15. Conídios + ML 1	13,7	17,0
16. Conídios + ML 2	29,5	21,5
17. Conídios + CAO ML 1	6,1	10,7
18. Conídios + CAO ML 2	6,4	9,5
19. Conídios + FIL ML 1	5,2	7,6
20. Conídios + FIL ML 2	8,2	14,0
21. Conídios + DIA ML 1	11,2	16,6*
21. Conídios + DIA ML 2	7,9	11,3
23. Conídios + SYL ML 1	13,9	15,2
24. Conídios + SYL ML 2	19,9	21,6
25. Conídios + MAI ML 1	15,7	15,8
26. Conídios + MAI ML 2	16,2	18,6

Continua...

Tabela 33. Continuação.

Formulações	Antes do armazenamento	Após perda de viabilidade
27. Conídios puros	34,5	20,0*
28. Conídios + LEI 1	19,3	21,4
29. Conídios + LEI 2	30,8	-
30. Conídios + CAO LEI 1	14,8	10,0*
31. Conídios + CAO LEI 2	32,5	-
32. Conídios + FIL LEI 1	32,3	-
33. Conídios + FIL LEI 2	26,6	-
34. Conídios + DIA LEI 1	24,1	11,1
35. Conídios + DIA LEI 2	19,4	-
36. Conídios + SYL LEI 1	31,6	17,0*
37. Conídios + SYL LEI 2	25,6	15,0*
38. Conídios + MAI LEI 1	32,0	-
39. Conídios + MAI LEI 2	28,5	-
40. Conídios puros	31,2	20,0*
41. Conídios + Mel 1	40,5	27,8
42. Conídios + Mel 2	38,1	-
43. Conídios + CAO Mel 1	30,7	18,6
44. Conídios + CAO Mel 2	23,3	9,5*
45. Conídios + FIL Mel 1	18,2	16,7*
46. Conídios + FIL Mel 2	25,6	15,4
47. Conídios + DIA Mel 1	32,8	9,4*
48. Conídios + DIA Mel 2	42,1	31,6
49. Conídios + SYL Mel 1	40,5	28,7*
50. Conídios + SYL Mel 2	37,6	20,6*
51. Conídios + MAI Mel 1	34,5	-
52. Conídios + MAI Mel 2	37,9	-

- Amostras contaminadas.

* Sem perda de viabilidade.

Tabela 34. Percentagens de unidade de formulações pós molháveis de conídios de *B. bassiana*. Temperatura $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Formulações	Antes do armazenamento	Após perda de viabilidade
1. Conídios puros	11,6	19,7*
2. Conídios + Dx 5% (1)	10,0	22,4
3. Conídios + Dx 15% (2)	13,2	21,8
4. Conídios + CAO Dx 1	4,8	12,3
5. Conídios + CAO Dx 2	8,8	13,3
6. Conídios + FIL Dx 1	8,8	11,6
7. Conídios + FIL Dx 2	9,1	14,5
8. Conídios + DIA Dx 1	6,3	11,5
9. Conídios + DIA Dx 2	10,3	12,6
10. Conídios + SYL Dx 1	13,5	12,2
11. Conídios + SYL Dx 2	11,3	14,3
12. Conídios + MAI Dx 1	11,1	16,7
13. Conídios + MAI Dx 2	11,7	15,5
14. Conídios puros	15,0	21,0*
15. Conídios + ML 1	8,9	19,6
16. Conídios + ML 2	9,7	20,0
17. Conídios + CAO ML 1	6,7	11,8
18. Conídios + CAO ML 2	7,6	13,7
19. Conídios + FIL ML 1	6,8	12,9
20. Conídios + FIL ML 2	7,2	12,6
21. Conídios + DIA ML 1	6,5	9,8
21. Conídios + DIA ML 2	7,1	13,3
23. Conídios + SYL ML 1	13,0	9,2
24. Conídios + SYL ML 2	12,0	12,6
25. Conídios + MAI ML 1	11,0	15,7
26. Conídios + MAI ML 2	11,0	14,1

Continua...

Tabela 34. Continuação.

Formulações	Antes do armazenamento	Após perda de viabilidade
27. Conídios puros	12,0	20,8*
28. Conídios + LC 1	11,7	22,9
29. Conídios + LC 2	10,0	11,6
30. Conídios + CAO LC 1	4,7	11,5
31. Conídios + CAO LC 2	4,3	11,4
32. Conídios + FIL LC 1	8,1	12,5
33. Conídios + FIL LC 2	6,2	11,7
34. Conídios + DIA LC 1	5,8	12,3
35. Conídios + DIA LC 2	6,3	12,9
36. Conídios + SYL LC 1	12,6	14,0
37. Conídios + SYL LC 2	8,0	14,5
38. Conídios + MAI LC 1	10,0	14,5
39. Conídios + MAI LC 2	8,1	15,3
40. Conídios puros	14,0	18,5
41. Conídios + Mel 1	24,4	20,2
42. Conídios + Mel 2	11,2	20,3
43. Conídios + CAO Mel 1	6,7	11,2
44. Conídios + CAO Mel 2	8,6	12,7
45. Conídios + FIL Mel 1	6,0	16,8
46. Conídios + FIL Mel 2	13,6	12,8
47. Conídios + DIA Mel 1	7,2	11,0
48. Conídios + DIA Mel 2	8,1	12,7
49. Conídios + SYL Mel 1	12,5	14,5
50. Conídios + SYL Mel 2	10,8	13,6
51. Conídios + MAI Mel 1	8,8	15,0*
52. Conídios + MAI Mel 2	11,6	15,4*

* Sem perda de viabilidade.

Tabela 35. Percentagens de umidade de formulações pós molháveis de conídios de *M. anisopliae*. Temperaturas 20, 25 e 30±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Após perda de viabilidade		
		20±1°C	25±1°C	30±1°C
1. Conídios + ARR	13,0	11,9	12,3	12,9
2. Conídios puros	13,5	16,3*	13,8	18,2
3. Conídios + Dx 30%	21,6	12,2	17,5	14,6
4. Conídios + LC 30%	12,9	10,4	8,6	11,2
5. Conídios + Dx SYL	19,7	16,5	17,8	17,0
6. Conídios + Dx AR	17,5	10,7	12,2	16,7
7. Conídios + LC SYL	14,9	12,2*	11,5*	13,4
8. Conídios + LC AR	11,7	9,5*	9,1*	7,7*
9. Conídios + MSI 30%	19,7	17,7	19,8	19,6
10. Conídios + MEU 30%	21,4	12,0	20,8	20,6
11. Conídios + MSI SYL	21,4	18,7	19,8	18,1
12. Conídios + MSI AR	17,2	14,8	13,6	15,2
13. Conídios + MEU AR	22,8	8,7	19,3	17,2
14. Conídios + MEU AR	18,0	12,7	15,5	16,8

AN/A - Antes do armazenamento.

Dx - Dextrose

LC - Lactose

SYL - Sylod

ARR - Arroz do meio de cultura

AR - Amido de arroz

MSI - Mel silvestre

MEU - Mel de eucalipto

* Sem perda de viabilidade.

Tabela 36. Percentagens de umidade de formulações pós molháveis de conídios de *B. bassiana*. Temperaturas 20, 25 e 30±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	AN/A	Após perda de viabilidade		
		20±1°C	25±1°C	30±1°C
1. Conídios + ARR	12,9	12,4*	12,7	12,9
2. Conídios puros	13,0	16,2*	16,8*	12,5
3. Conídios + Dx 30%	19,8	16,0	19,4	22,6
4. Conídios + LC 30%	14,9	12,9	16,3	16,3
5. Conídios + Dx SYL	17,1	12,5	14,8	18,8
6. Conídios + Dx AR	17,3	14,3	17,1	19,1*
7. Conídios + LC SYL	15,5	11,7*	12,9	18,0
8. Conídios + LC AR	12,3	12,7	10,8	15,8
9. Conídios + MSI 30%	17,8	19,5	23,3	24,0
10. Conídios + MEU 30%	19,6	19,1	21,2	23,8
11. Conídios + MSI SYL	20,1	13,0	16,4	15,5
12. Conídios + MSI AR	16,3	15,8	15,3	14,4
13. Conídios + MEU AR	18,8	16,4	16,3	15,2
14. Conídios + MEU AR	15,8	14,5	15,1	16,3

AN/A - Antes do armazenamento.

* Sem perda de viabilidade.

Dx - Dextrose

LC - Lactose

SYL - Sylod

ARR - Arroz do meio de cultura

AR - Amido de arroz

MSI - Mel silvestre

MEU - Mel de eucalipto

* Sem perda de viabilidade.

Tabela 37. Percentagens de unidade de formulações com micélios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Temperaturas de 25, 30 e 35±1°C e fotofase de 12 horas.

Formulações	Antes do armazenamento	Após perda de viabilidade		
		25±1°C	30±1°C	35±1°C
<i>B. bassiana</i>				
Alginato de sódio	32,5	15,4	22,3	8,0
Amido de milho	13,5	11,3*	13,9*	7,2
<i>M. anisopliae</i>				
Alginato de sódio	25,2	15,5	22,1	6,4
Amido de milho	11,9	11,2	12,8	6,7

* Sem perda de viabilidade.